

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik
der Justus Liebig-Universität Gießen
(Direktor: Prof. Dr. K. Vosschulte)

Herstellung biologischer Herzklappentransplantate

**Vergleichende morphologische und chemische
Untersuchungen an homologen und heterologen
Aortenklappentransplantaten nach Anwendung
verschiedener Konservierungs- und Sterili-
sationsverfahren**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der *venia legendi*
an der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
F. W. Hehrlein
aus Kaiserslautern

1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545914_0051

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik
der Justus Liebig-Universität Gießen
(Direktor: Prof. Dr. K. Vosschulte)

Herstellung biologischer Herzklappentransplantate

**Vergleichende morphologische und chemische
Untersuchungen an homologen und heterologen
Aortenklappentransplantaten nach Anwendung
verschiedener Konservierungs- und Sterili-
sationsverfahren**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der venia legendi
an der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
F. W. Hehrlein
aus Kaiserslautern

Der Herr Dr. J. J. H. van der
Wijk, der Herr Dr. J. J. H. van der
Wijk, der Herr Dr. J. J. H. van der

Versteek van de
Versteek van de
Versteek van de
Versteek van de
Versteek van de
Versteek van de
Versteek van de
Versteek van de
Versteek van de
Versteek van de



Der Herr Dr. J. J. H. van der
Wijk, der Herr Dr. J. J. H. van der
Wijk, der Herr Dr. J. J. H. van der

Der Herr Dr. J. J. H. van der
Wijk, der Herr Dr. J. J. H. van der
Wijk, der Herr Dr. J. J. H. van der

I N H A L T S A N G A B E

Seite:

I.	<u>Einleitung</u>	1
II.	<u>Problemstellung</u>	7
III.	<u>Synopsis der angewandten Konservierungs- und Sterilisationsverfahren</u>	9
	1. Geschichtliche Entwicklung der Gewebe- konservierung	9
	2. Lyophilisation ohne zusätzliche Steri- lisationsmaßnahmen	13
	3. Lyophilisation und Äthylenoxyd-Steri- lisation	17
	4. Lyophilisation und Beta-propiolacton- Behandlung	18
	5. Lyophilisation und Gammastrahlensteri- lisation	19
	6. Feuchtkonservierung in äquibrierter Cialitlösung	20
IV.	<u>Eigene Entwicklung einer Gefriertrocknungs- anlage mit gekoppelter Äthylenoxydgas-Steri- lisation und Aufbau einer Herzklappenbank</u>	23
V.	<u>Herstellung der Präparate für vergleichende Untersuchungen</u>	38

VI.	<u>Morphologische Untersuchungen</u>	40
	1. Methodik	40
	2. Ergebnisse	41
VII.	<u>Das Verhalten heterologer Aortenklappen-</u> <u>transplantate nach ektooper Verpflanzung</u> <u>in den tierischen Organismus</u>	51
VIII.	<u>Chemische Untersuchungen</u>	65
	1. Methodik	66
	2. Ergebnisse	71
IX.	<u>Diskussion</u>	82
X.	<u>Zusammenfassung</u>	93
XI.	<u>Literatur</u>	96

I. Einleitung

Die erste Anwendung eines Plexiglaskugelventils zur Behandlung einer schweren Aorteninsuffizienz durch HUFNAGEL (45) im Jahre 1952 und die Pionierarbeit von GIBBON (31) und LILLEHEI (55) in den Jahren 1953 bis 1960 auf dem Gebiete der extrakorporalen Zirkulation schufen die Voraussetzungen für die heute zur Routine gewordene chirurgische Behandlung erworbener Herzklappenfehler. Im Jahre 1960 entwarf HARKEN (33) die erste Aortenklappenprothese zum Totalersatz der erkrankten Aortenklappe durch situsgerechte Implantation in subkoronare Position. Technische Verfeinerungen führten bald darauf zur Entwicklung des allgemein bevorzugten Starr-Edwards-Kugelventils (94), welches bis heute nach den Angaben von BRAUNWALD (15) bereits in einer Stückzahl von über 49 000 verkauft worden ist. Ausführungen verschiedener Linsenventile, die sich wegen der Kleinheit ihres Käfigs besonders zum Ersatz der erkrankten Mitralklappe eignen, kamen hinzu und fanden weitverbreitete Anwendung.

Trotzdem wächst die Zahl der Jahr für Jahr neu erscheinenden Modelle künstlicher Herzklappen unaufhaltsam, und bereits bestehende Grundtypen - ganz gleich ob Kugel- oder Linsenventile - erfahren oft schon nach kurzer klinischer Erprobung Abänderungen, sei es in der Form, oder der Zusammensetzung des Materials. Viele der zunächst mit Erwartung aufgenommenen Kunststoffventilmechanismen werden alsbald vom weiteren Gebrauch ausgeschlossen.

Der Grund für die stetige Suche nach neuen, besseren Klappenkonstruktionen liegt letztlich in dem Unbehagen über die Nachteile, mit denen zwangsläufig alle Kunststoffventile mehr oder minder behaftet sind: Vorzeitiger Materialverschleiß, Infektionen mit Ausreißen der Prothese aus dem Nahtgebiet, mechanische Bluttraumatisierung mit Hämolyse und ernste thrombembolische Komplikationen machen häufig die ausgezeichneten Anfangserfolge nach künstlichem Klappenersatz zunichte. Ein weiteres, ungelöstes Problem stellt die Behinderung des Zentralflows durch Kugel oder Linse im Kunststoffventil dar; diese vermochte J. WADA durch die Entwicklung seiner "Hingeless Valve", einem Scheibenventil mit excentrischer Aufhängung und einem Öffnungswinkel von 75° zu einem gewissen Teil zu vermindern (102).

Aus den angeführten Gründen hat man versucht, durch die Transplantation autologer, homologer und heterologer Gewebe neue Wege des Klappenersatzes zu beschreiten. MURRAY's und LAM's (70, 52) Ergebnisse und Erfahrungen bei der Verpflanzung homologer Aortenklappensegmente in die Aorta descendens zur chirurgischen Behandlung der Aorteninsuffizienz im Jahre 1956 bildeten die Anregung zu der seit 1962 stetig zunehmenden klinischen Anwendung biologischer Gewebe zur Beseitigung erworbener Herzklappenvitien. Die Entwicklung ideenreicher Operationsverfahren in den letzten Jahren verbindet sich vor allem mit den Namen BARRAT-BOYES (7, 8), BERNHARD (10), BIGELOW (11), BINET (12), DURAN (27), HUBKA (42),

IONESCU (47, 48), ROSS (83, 85, 86) und SENNING (90, 91), um nur einige zu nennen. Die Skala der entwickelten Operationsmethoden reicht von der Verpflanzung einzelner Aortentaschenklappensegel oder deren Nachbildung aus Faszienstreifen bis zur En-bloc-Übertragung des gesamten Mitralapparates, einschließlich Sehnenfäden und Papillarmuskelansätzen.

Dominierend blieb schließlich die menschliche und tierische Aortenklappe als biologisches Ersatzventil bei jeder Form einer hochgradigen Herzklappenschädigung. Ihre Implantation hat sich sowohl in subkoronarer Aortenposition als auch "invertiert" in Mitralposition gleichermaßen bewährt. Zur schnelleren und einfacheren Insertion wurden in den letzten Jahren immer wieder neue Modelle von Halterungen entwickelt, die es gestatten, vorgefertigte Klappentransplantate in genügender Anzahl und verschiedener Größe bereitzustellen und sicher zu implantieren (ANGELL und Mitarbeiter, 5), (BRAUNWALD und Mitarbeiter, 16), (CARPENTIER, 19), (GEHA und Mitarbeiter, 30), (HEHRLEIN, 38), (IONESCU und WOOLER, 47), (SUGIE und Mitarbeiter, 87) u.a.m.

Die geringe immunologische Aktivität der vorwiegend aus kollagenem Bindegewebe bestehenden Aortentransplantate gestattet ohne Bedenken auch die Verwendung heterologen Spendermaterials, vor allem von Kalb und Schwein. Neben den Vorteilen, auf diesem Weg in unbegrenzter Anzahl Transplantate aus gesunden, jugendlichen Organismen gewinnen zu können, gelang

damit auch die Kollektionierung von Herzklappen mit ausreichend großem Diameter, eine Voraussetzung, die besonders für den Mitralklappenersatz durch invertiert implantierte Aortenklappentransplantate von Bedeutung ist.

Die Bevorzugung der Aortenklappe als biologisches Ersatzventil basiert, wie schon zum Teil erwähnt, auf folgenden günstigen Voraussetzungen:

1. Sie stellt vom morphologischen Aufbau und der biochemischen Zusammensetzung her ein Gewebe eigener Art dar (BÜRGER, 18). Infolge ihrer geringen Zelldichte und des Mangels an Vaskularisation werden Immunreaktionen nach der Transplantation nicht in dem Maße beobachtet, wie bei der Verpflanzung anderer Gewebe. Dies wurde vor allem durch die klinischen Untersuchungen von DAVIES und Mitarbeiter (26) und HUDSON (43) bestätigt. Eine völlige immunologische Inaktivität kann dem Aortenklappengewebe jedoch nicht zugesprochen werden.
2. Ihre Architektur stellt in funktioneller Hinsicht einen idealen Ventilmechanismus dar. Der unbehinderte Zentralfluß durch die geöffnete Klappe gewährleistet eine den physiologischen Anforderungen immer angepaßte Hämodynamik (ROSS, 85, 86).
3. Einheilungsstörungen werden nach den Angaben aller Autoren, die sich bisher mit der Transplantation, sowohl homologer als auch heterologer Klappengewebe, befaßten, nur selten beobachtet. Damit sind Komplikationen, wie sie u.a. COHN und Mitarbeiter (22) und ANDERSON und Mitarbeiter (4) beim künstlichen Klappenersatz beschrieben, weitgehend ausgeschaltet.
4. Chronische Hämolyse durch mechanische Traumatisierung des Blutes durch den stetigen Kugelschlag ist bei Verwendung biologischer Gewebe ausgeschlossen (MURRAY und Mitarbeiter, 69), (McHENRY und Mitarbeiter, 40).

5. Thrombembolische Komplikationen, die nach Kunststoffklappenersatz ein ernstes Problem darstellen und immer eine prophylaktische Langzeitbehandlung mit Antikoagulantien erfordern, treten nach homologem und heterologem Klappenersatz so gut wie nie auf. Eine Marcumarterapie kann auf diesem Wege vermieden werden (ALIEFF, 1).
6. Die Transplantate sind bei guter Zusammenarbeit von Kliniker, Pathologe und Veterinärmediziner einfach zu gewinnen. Ihre Verarbeitung ist zwar zeitraubend, jedoch wenig kostspielig. Mit einiger Übung in präparatorischer Feinarbeit erfordert die Herstellung eines homologen oder heterologen Transplantates einen Zeitaufwand von 3 bis 4 Stunden (Abb. 1 bis 3).

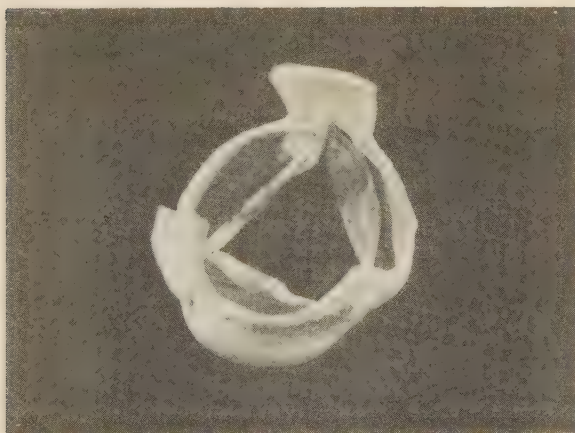


Abb. 1: Lyophilisiertes Aortenklappentransplantat aus eigener Klappenbank zum homologen Klappenersatz der Aortenklappe.

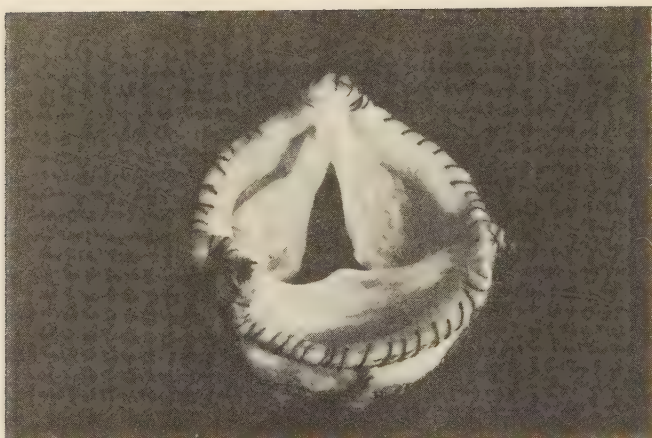


Abb. 2: Feucht konserviertes, durch eine Halterung stabilisiertes Kälberaortentransplantat zum heterologen Mitralklappenersatz aus eigener Klappenbank

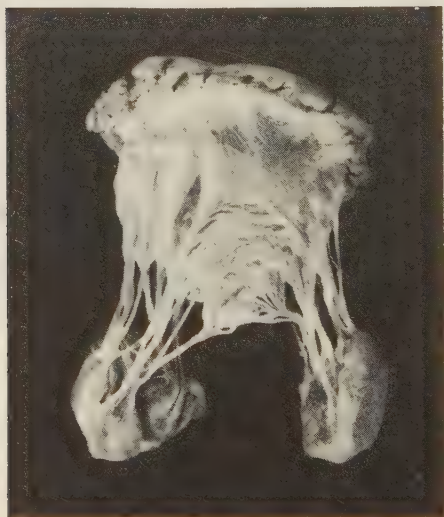


Abb. 3: Lyophilisiertes Mitralklappentransplantat für homologe En-bloc-Übertragung der Mitrals

II. Problemstellung

Zum reibungslosen Ablauf eines Herzklappenersatzes im Rahmen eines unter Anwendung der extrakorporalen Zirkulation durchgeführten offenen Eingriffes ist das Vorhandensein einer ausreichenden Anzahl steriler Ersatzventile verschiedener Größen erforderlich. Mindestens vier abgestufte Durchmesser für den Mitralklappenersatz und sechs bis acht Größenordnungen für den Aortenklappenersatz sollten zur Anpassung an den jeweiligen Diameter des Annulus nach Excision des zerstörten Klappengewebes zur Verfügung stehen. Die Ablagerung genormter Kunststoffventile auf lange Zeit geschieht ohne Schwierigkeiten.

Ein ganz anderes Vorgehen verlangt die Kollektio-
nierung homologer und heterologer Klappentransplantate. Die für eine spätere Einpflanzung vorgesehenen biologischen Gewebe müssen zur Aufbewahrung in einer eigens hierfür errichteten Klappenbank einem Konservierungsverfahren unterzogen werden. Da meistens eine streng aseptische Entnahme und Weiterverarbeitung der Spendergewebe nicht gewährleistet ist, besteht die Notwendigkeit, die Konservierung mit einer sicheren Sterilisation zu verbinden. Dies bedeutet, je nach Art der angewandten Verarbeitungsmethode, nicht selten eine folgenschwere Schädigung der biologischen Grundstruktur der Gewebe. Langzeitbeobachtungen von mehr als sechs Jahren aus dem Krankengut von D.N.ROSS (86) haben ergeben, daß eine unerwartet hohe Anzahl von Patienten vier Jahre nach homologem Aortenklappenersatz Insuffizienzsymptome

auf Grund einer Frühverkalkung der Transplantate entwickelten. Eigene Untersuchungen an konservierten und nicht implantierten biologischen Geweben ließen vermuten, daß eine sterilisations- und konservierungsbedingte Gewebeschädigung der Anlaß für Frühveränderungen an transplantierten Klappen sein könnte.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit sollte die Beurteilung sein, inwieweit sich eine unterschiedliche Beeinflussung der zu transplantierenden Gewebe durch einige der derzeit gebräuchlichsten Konservierungs- und Sterilisationsverfahren nachweisen läßt, und ob sich auf Grund der durchgeführten Untersuchungen Hinweise erarbeiten lassen, die die klinische Anwendung des einen oder anderen Verfahrens befürworten oder ablehnen. Das Hauptgewicht wurde hierbei auf die Interpretation morphologischer Strukturveränderungen und Störungen des Kollagenbestands der menschlichen und tierischen Aortenklappe gelegt.

III. Synopsis der angewandten Konservierungs- und Sterilisationsverfahren

1. Geschichtliche Entwicklung:

Die autoplastische Gewebetransplantation ist mit dem Nachteil einer meist erheblichen Verlängerung des operativen Eingriffs verbunden und läßt sich nur bei der Verpflanzung entbehrlicher Gewebeteile des Organismus durchführen. Ihre Anwendung findet in der Herzklappenchirurgie nur wenig Raum, obgleich D.N.ROSS (84) in einigen ausgewählten Fällen bei jugendlichen Patienten bereits mit gutem Erfolg eine autologe Verpflanzung der Pulmonalklappe zum Aortenklappenersatz vorgenommen und die hämodynamisch weniger belastete Pulmonalklappe durch ein Ventil oder homologes Transplantat ersetzt hat.

Homoioplastische Gewebe stehen oft dann nicht zur Verfügung, wenn sie gerade benötigt werden. Nichts lag deshalb in der plastischen Chirurgie näher, als nach Möglichkeiten zu suchen, durch Konservierung von Transplantationsmaterial einen Bestand an implantationsbereitem Gewebe zu sichern.

Nach NEUMANN (71) finden sich die ersten Hinweise auf eine zweckgebundene Gewebekonservierung im Sinne der Errichtung einer "Organbank" bei

dem Engländer BREWER (17), der im Jahre 1881 in Papier eingeschlagene Hautteile eines Verstorbenen 36 Stunden lang aufbewahrte, um sie dann auf die Wundfläche eines 38jährigen Patienten zu übertragen.

Seither wurden zahlreiche Konservierungsverfahren entwickelt und ihre klinische Anwendbarkeit untersucht und erprobt. Eine Klassifizierung der oft von differierenden Gesichtspunkten ausgehenden Konservierungsmethoden ist schwierig:

Autoren wie CONWAY und STARK (24) unterscheiden im Hinblick auf das Fortbestehen histologischer Zellfunktionen homovitale und homostatistische Transplantate.

Bei der homovitalen Transplantation bleibt die Zellfunktion auch nach der Überpflanzung erhalten, während es sich bei homostatistischen Transplantationen um Gewebe handelt, die zwar in den Organismus eingebaut werden, deren Zellen aber im Verlauf des Konservierungsprozesses nicht lebend erhalten bleiben. Die Frage "vitalen" oder "devitalisiertes" Gewebe, ist für die Wahl des Verfahrens der Gewebekonservierung von besonderer Bedeutung. So selbstverständlich die Erhaltung der Vitalität bei der Verpflanzung endokriner Drüsen beispielsweise angestrebt werden muß, so vorteilhaft kann die Devitalisierung von Geweben sein, deren Aufgabe bei der Transplantation nur darin besteht, durch ihre spezielle

anatomische Struktur als Gerüst und Leitschiene, oder dadurch zu wirken, daß sie die Regenerationsfähigkeit des Wirtes aktivieren. Hinzu kommt, daß sich durch Aufhebung der Vitalität der Gewebe wahrscheinlich auch die Antigen-Eigenschaften weitgehend reduzieren lassen.

Auch im Hinblick auf die verlängerte - oft unbegrenzte - Lagerungsfähigkeit werden heute fast ausschließlich ihrer Vitalität beraubte Gewebe verpflanzt.

Überblickt man die verschiedenen Möglichkeiten der Gewebekonservierung, so muß man feststellen, daß ihre Anzahl ständig wächst, ja unübersehbar wird.

Die beste Form der Klassifizierung dieser Vielzahl von Arbeitsmethoden scheint BORNEMISZA (13) gelungen zu sein, der folgende Einteilung trifft:

A. Chemische Konservierungsverfahren

1. Mit Erhaltung der Lebensfähigkeit der Gewebe:
Aufbewahrung der Transplantate in physiologischer NaCl - Lösung, Tyrode - Lösung, Cross'scher Lösung, Hank'scher Lösung u.a. bei Eisschranktemperatur.
Konservierungszeit 10 bis 14 Tage.
2. Ohne Erhaltung der Lebensfähigkeit der Gewebe:
Aufbewahrung der Transplantate in Kochsalzlösung mit Chloroformzusatz, in Sublimat-Alkohol, in 4%iger Formalinlösung, in Jores - Lösung, in Merthiolat, Cialit, Palacos u.a.
Lagerungszeit bis mehrere Monate.

B. Biologische Konservierungsverfahren

Darunter versteht man die Aufbewahrung der Transplantate in homologem Blut oder Blutserum, meist unter Antibiotikazusatz im Kühlschrank in der Nähe des Gefrierpunktes.

C. Physikalische Konservierungsverfahren

1. Anwendung von Hitze
2. Tiefkühlung
3. Tiefkühlung, kombiniert mit Austrocknung des Transplantationsmaterials (Lyophilisation)

Aus der Vielzahl der zur Verfügung stehenden Konservierungsverfahren haben sich heute vor allem die Aufbewahrung in Nährlösungen, die Tiefkühlungstechnik, die Lyophilisation und Einlagerung in Merthiolat und Cialit durchgesetzt.

Die Nährlösungen sind mit dem Nachteil behaftet, daß sie nicht in der Lage sind, das antigene Potential zu reduzieren oder gar aufzuheben. Die Tiefkühlung, und besonders die Gefriertechnik mit flüssigem Helium und Temperaturen von -269 Grad Celsius, ist kostspielig und hat ferner den Nachteil, daß sich tiefgefrorene Gewebe nur schwer transportieren lassen.

Aus diesem Grund wurden für die vorliegenden Untersuchungen zur Konservierung von Herzklappengeweben schließlich zwei Verfahren ausgewählt, nämlich die Lyophilisation und die Feuchtkonservierung in Cialitlösung. Da Cialit gleichzeitig konservierende, bakterizide und fungizide Eigenschaften besitzt,

ist eine Kombination mit sterilisierenden Agenzien nicht notwendig. Die Gefriertrocknung verlangt die zusätzliche Anwendung eines sicheren Sterilisationsverfahrens.

Im Rahmen der zu erörternden Methodik sollen zunächst die für alle späteren Untersuchungen an den zu testenden Herzklappen in gleicher Weise und zu gleichen Bedingungen durchgeführten Konservierungs- und Sterilisationsverfahren besprochen werden.

III 2. Lyophilisation ohne zusätzliche Sterilisationsmaßnahmen:

Die Anfänge der Gefriertrocknungstechnik gehen bis in das frühe 19. Jahrhundert zurück (LESLIE, 1811; WOLLASTON, 1813; zitiert nach NEUMANN). Im Jahre 1890 beschrieb ALTMANN (3) erstmals die Trocknung frischer Organstückchen unter Vakuumbedingungen (Abb. 4).

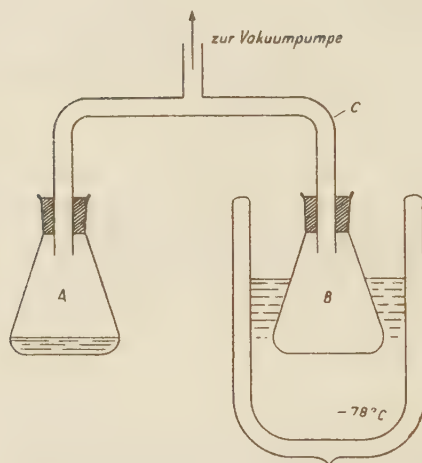


Abb. 4: Grundform einer einfachen Gefriertrocknungsanlage, bestehend aus Trockenraum (A), Eiskondensator (B) und Vakuumleitung (C) nach D'ARSONVAL und BORDAS.
(Aus NEUMANN: Grundriß der Gefriertrocknung).

Seit der Einführung der Gefriertrocknung durch FLOSDORF und MUDD (28) im Jahre 1935 zur Konservierung von Serum und biologischen Substanzen findet dieses Verfahren in zahlreichen Gewebebanken systematische Anwendung.

Das Prinzip der Methode besteht darin, Gewebeteilen durch Einfrieren und Sublimation des Eises unter Vakuum, fast den gesamten Wasserbestandteil (bis zu einer Restfeuchtigkeit von 0,5 bis 1%) zu entziehen und sie dadurch unbegrenzt haltbar zu ma-

chen. Die Freudigkeit des so behandelten Gewebes, sich in Wasser erneut und relativ schnell zu rekonstituieren, gaben dieser Methode den Namen "Lyophilisation".

Die Einfrierung des Trockengutes, der Beginn eines jeden Lyophilisationsvorganges, kann in verschiedenen Modifikationen vor sich gehen (extrem langsam, langsam, schnell, extrem schnell, in Kombination mit Schutzlösungen). Die grundlegenden Untersuchungen über die sich hierbei abspielenden physikalischen Vorgänge in wasserhaltigen Geweben gehen zurück auf LYET (57) und REY (81).

Nach der Einfrierung beginnt der eigentliche Prozess der Lyophilisation und zwar die unmittelbare Überführung von Eis in Dampf unter dem ständigen Abtransport des hierbei gebildeten Wasserdampfes. In dieser ersten Phase der Sublimation, die durchschnittlich etwa $\frac{1}{3}$ der Gesamttrocknungszeit beansprucht, wird aus dem Trockengut die Feuchtigkeit bis auf etwa 3 bis 6% des Trockengewichtes entfernt. Während dieser Zeit müssen Tiefkühlung und Vakuum aufrecht erhalten bleiben. Während der zweiten Phase, dem sogenannten Residualabschnitt (BORNEMISZA, 13), wird dem Gewebe bei Zimmertemperatur die Restfeuchtigkeit bis auf 0,5 bis 1% entzogen.

Die Entfernung des Wasserdampfes läßt sich entweder durch direkten Abpumpvorgang oder Kondensation an Kühlflächen oder durch Absorption an hygroscopische Substanzen erreichen.

Für die Entfernungsgeschwindigkeit des aus dem Trockengut absublimierten Wasserdampfes im Hochvakuum gilt die von KNUDSEN (50) aufgestellte Gleichung.

$$Qr = \frac{4}{3} \cdot \sqrt{\frac{2\pi M}{RT}} \cdot \frac{r^3}{L} \cdot (Pa - Pb)$$

Hierbei bedeutet: M = Molekulargewicht von Wasser

R = Gaskonstante

T = absolute Temperatur des Trockengutes

r = Radius der Gasabflußröhren

L = Länge Trockengut - Ausfrier-tasche

Pa = aktueller Partialdruck des Wasserdampfes über dem Trockengut

Pb = Partialdruck des Wasserdampfes über der Ausfrier-tasche oder dem Absorptionsmittel.

Entscheidend für die Haltbarkeit der durch Gefriertrocknung konservierten Präparate ist ihre Restfeuchtigkeit nach Abschluß der Trocknung. Dies gilt besonders für die Herstellung devitalisierter Herzklappentransplantate. Dagegen ist die Bedeutung der Restfeuchtigkeit für die Haltbarkeit von vitalen Präparaten (Viren, Bakterien etc.) noch nicht geklärt und keineswegs frei von Widersprüchen.

III 3. Lyophilisation und Äthylenoxyd-Begasung

Eine Herstellung lagerungsfähiger und implantationsreifer Aortenklappentransplantate allein durch Lyophilisation der präparierten Herzklappen ist theoretisch durchführbar, wenn man von Beginn der Transplantatentnahme bis zum endgültigen Verschuß der zugeschnittenen Klappe in einem Aufbewahrungsgefäß die Möglichkeit hat, unter streng aseptischen Kautelen zu arbeiten. Die praktische Handhabung einer sicheren sterilen Entnahme und Bearbeitung der Herzklappen bleibt problematisch, ja in Frage gestellt. Deshalb hat man versucht, durch zusätzliche Anwendung sterilisierender Agenzien den Verarbeitungsprozeß lagerungsfähiger Transplantate zu vereinfachen.

Äthylenoxyd hat sich hierbei schnell als ein sicheres Sterilisationsmittel durchgesetzt und fand bereits 1953 durch HUFNAGEL (44) klinische Anwendung bei der Transplantation von Arteriensegmenten. Sowohl flüssig als auch gasförmig garantiert es eine sichere Gewebesterilisation COLLINS und FORSTER, 23).

Da flüssiges Äthylenoxyd explosiv und höchst feuergefährlich ist (Siedepunkt bei 10,8 Grad Celsius), hielten wir wie PICKERING (76) die Verwendung der handelsüblichen Mischung von 10% Äthylenoxyd und 90% CO₂ als Gas für unsere Belange am geeignetsten. Grundlegende Untersuchungen über die Möglichkeiten dieses Sterilisationsverfahrens finden sich ferner bei THOMAS (100) und BRACKEN und Mitarbeiter (14).

III 4. Lyophilisation und Beta-propiolacton-Behandlung (BPL)

Ausgehend von den Erfahrungen F.W.HARTMAN's (35) über die sterilisierende Wirkung von BPL in virenverseuchtem Plasma und Vollblut ohne zerstörende Nebenwirkungen auf die Plasmaproteine, haben SZILAGYI und Mitarbeiter (93) dieses Verfahren zur Sterilisation unsteril entnommener Arterientransplantate in die Klinik eingeführt. TRAFAS, CARLSON und LAM (101) unterstrichen die sterilisierende Wirkung von BPL auf kontaminierte Kaninchenarterientransplantate.

Beta-propiolacton ist ein Ester der Hydroxy-Propionsäure, stabil in seiner konzentrierten Form, jedoch höchst instabil bei Lösung in Wasser. Der Lactone-Ring

$$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{C} = \text{O} \\ | \\ \text{CH}_2 - \text{O} \end{array}$$

reagiert leicht mit SH-, COOH-, OH-, Phenol- oder

Aminogruppen. Im allgemeinen gilt die Sterilisation kontaminierter biologischer Gewebe nach einer Kontaktzeit von zwei Stunden mit einer 0,75 %igen Lösung als gesichert.

Für die Herstellung unsteril entnommener homologer und heterologer Aortenklappentransplantate haben wir routinemäßig eine einstündige Aufbewahrung der Transplantate in einer 1 %igen Beta-propiolacton-Lösung durchgeführt. Durch Zugabe kleiner Dosen von NaOH-Lösung wurde der pH-Wert nach den Angaben von SZILAGYI auf 7,0 bis 7,4 gehalten.

Nach vollzogener Sterilisation wurden die Transplantate unter aseptischen Kautelen in sterile Aufbewahrungsgefäße zur nachfolgenden Lyophilisation eingebracht.

III 5. Lyophilisation und Gammastrahlensterilisation

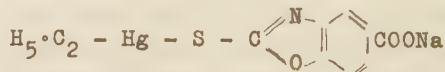
Die grundlegenden Untersuchungen über die Möglichkeiten der Anwendung energiereicher Strahlen zur Sterilisation organischer Gewebe von MEEKER und Mitarbeitern (65), sowie HUI und seiner Arbeitsgruppe (46) stammen aus dem Jahre 1951. MACRIS, SLOAN und OREBAUGH (61) propagierten im Jahre 1954 die Gammastrahlensterilisation als einfache und effektive Methode zur Keimfreimachung von homologen Arterien Geweben. Durch intensive bakteriologische Studien an der Universität Michigan konnte nachgewiesen werden, daß eine Dosis von 2,000 000 rep (roentgen-equivalent-physical) in der Lage ist, alle für eine Kontamination von Arterientransplantaten in Frage kommenden Organismen zu zerstören. Um eine Dosis von 4,000 000 rep zu erreichen, müssen die zu sterilisierenden Gewebe für ungefähr 16 Stunden der Strahlungsenergie der Kobalt - 60 - Quelle ausgesetzt werden. Da die Gammabestrahlung eine Ionisation hervorruft, sind stärkere oxydative Reaktionen in Anwesenheit von Wasser zu erwarten. Ein besonders günstiger Effekt in Bezug auf minimale Gewebeerstörung durch die Strahlungsenergie sollte demnach bei der Bestrahlung wasserfreier, lyophilisierter Gewebe erwartet werden können.

Die für die vorliegenden Untersuchungen hergestellten Aortenklappentransplantate wurden jeweils mit einer Gesamtdosis von 2,5 Mrad bestrahlt. Die Bestrahlung wurde an unsteril entnommenen, lyophilisierten und vakuumdicht verschlossenen Präparaten durchgeführt. +

III 6. Feuchtkonservierung in äquilibrierter Cialitlösung

Die bakterizide und fungizide Wirkung von Quecksilberverbindungen ist schon lange bekannt. MARKS und POWEL (63) hoben bereits 1931 die beachtenswerte antiseptische Aktivität des Merthiolats hervor, welches 1949 von REYNOLDS und OLIVER (82) zur Konservierung von Knochenspänen eingesetzt wurde. Histologische Untersuchungen an merthiolat-konservierten Gefäßen zeigten jedoch nicht unerhebliche Gewebeschädigungen. Unter den verschiedenen Quecksilberverbindungen hat sich dann vor allem das 2-äthylmercuri-mercapto-benzoxazol-5-carbonsaure Natrium (Cialit) als brauchbares, bakterizides Konservierungsmittel durchgesetzt.

Es besitzt folgende Strukturformel:



Der Firma B. Braun, Melsungen, sei an dieser Stelle besonders für die Durchführung der Gammastrahlensterilisation unserer Präparate, sowie für ihre stetige Unterstützung gedankt.

Eingehende Untersuchungen von CARPENTIER (20) befaßten sich damit, eine Konservierungslösung für heterologe Herzklappentransplantate mit der Grundsubstanz Cialit herzustellen, die rasch klinische Anwendung fand. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die von CARPENTIER und AUDHOUI zusammengestellte Spül- und Konservierungslösung ohne Modifikation übernommen. Sie besitzt einen pH von 7,22 und eine Osmolarität von 320 mMol/l. Zur Kontrolle des physikalisch-chemischen Gleichgewichts ist ihr Phenolrot als Indikator beigegeben.

Die Wiedergabe der Zusammensetzung der Lösung ist der Originalarbeit von CARPENTIER entnommen:

a) Lösung I (Spüllösung):

Stammlösung:

- Tris hydroxymethylaminomethan	24,2 g
- Maleinsäure	23,2 g
- Aqua bidest. (vorher für 1/2 Stunde zum Sieden gebracht, um das CO ₂ zu eliminieren)	1000 ml

Lösung I:

- Stammlösung	250 ml
--NaOH-Lösung 0,2 N	240 ml
- 2 E.M.M.B. - 5 C.S. +	0,10 g
Aqua bidest. q.s.p.	1000 ml

+ Cialit. Asid-Institut GmbH München

b) Lösung II (Konservierungslösung):

Stammlösung:

- Tris hydroxymethylaminomethan	24,2 g
- Maleinsäure	23,2 g
- Aqua bidest. (vorher für 1/2 Stunde zum Sieden gebracht, um das CO ₂ zu eliminieren)	1000 ml

Lösung II:

- Stammlösung	250 ml
- NaOH-Lösung 0,2 N	240 ml
- 2 E.M.M.B. - 5 C.S.	0,01 g
- Phenolrot	0,005 g
- Aqua bidest. (CO ₂ -frei) q.s.p.	1000 ml

IV. Eigene Entwicklung einer Gefriertrocknungsanlage mit gekoppelter Äthylenoxydgas-Sterilisation und Aufbau einer Herzklappenbank

Die physikalischen Grundprinzipien eines Lyophilisationsprozesses sind in Kapitel III/2 dargestellt.

Zur routinemäßigen Zubereitung chirurgischen Transplantationsmaterials, insbes. von lyophilisierten homologen und heterologen Aortenklappen, sollte eine Anlage entwickelt werden, die drei wesentliche Voraussetzungen erfüllt:

1. Eine hochwertige Gefriertrocknung mit geringer Restfeuchtigkeit.
2. Eine sichere Sterilisation.
3. Einen einfachen und dauerhaften Verschlußmechanismus für die Rezipienten der Transplantate.

Eine Reihe von Vorversuchen zur Herstellung biologischer, lagerungsfähiger Gewebe wurde zunächst mit einer freundlicherweise von der Firma F. Kniese, Marburg, zur Verfügung gestellten Industrieanlage durchgeführt (Abb. 5).



Abb. 5: Industrieanlage zur Herstellung lyophilisierter biologischer Gewebe zu Transplantationszwecken

Hierbei mußten die Transplantate in getrennten Dewar-Gefäßen in einem Trockeneis-Alkoholgemisch eingefroren, dann an eine Vakuumkammer angeschlossen und und schließlich nach Beendigung des Trocknungsvorganges in ihren Aufbewahrungsgläsern mit Pizeinwachs versiegelt werden. Ein gesichert steriles Arbeiten ließ sich auf diese Weise nicht garantieren. Die sinnvolle Modifikation des üblichen Gefriertrocknungsprozesses bestand also zunächst darin, einen Rezipienten für die herzustellenden Transplantate mit einem Verschlußmechanismus zu entwerfen, in dem das einzelne Präparat sowohl eingefroren als auch getrocknet, sterilisiert und endgültig unter Vakuum verschlossen werden kann.

Es wurde schließlich eine Anlage entwickelt, die nach folgendem Prinzip arbeitet:

a) Technischer Aufbau

Mittels einer zweistufigen, wassergekühlten Kältemaschine mit dem Kältemittel R13 B1 wird ein wärmeisoliertes Tiefkühlsolebad von reinem Methanol auf einer Temperatur von -75 Grad Celsius bis -80 Grad Celsius gehalten. Das Kühlsolebad umspült drei, als Vakuumkammern dienende Glasvorlagen, die sowohl einen Hochvakuum- als auch einen Begasungsanschluß, der jeweils mit einem Kernschliff versehen ist, besitzen. Die das Vakuum erzeugende zweistufige Vakuumpumpe (Type RO 6) hat eine Ansaugleistung von $6 \text{ m}^3/\text{Stunde}$ und erreicht einen Enddruck von etwa $5 \cdot 10^{-5} \text{ mm Hg}$. Die Druckmessung erfolgt über einen McLeod. Die Glasvorlagen bzw. Vakuumkammern, werden durch je eine Metallkappe mit gefetteten Gummidichtungen verschlossen. Diese Metallkappen dienen gleichzeitig als Halterung für Spezialgläser zum

Aufbewahren der Transplantate und besitzen einen Kurbelzug zum Verschluß der Rezipienten (Abb. 6).

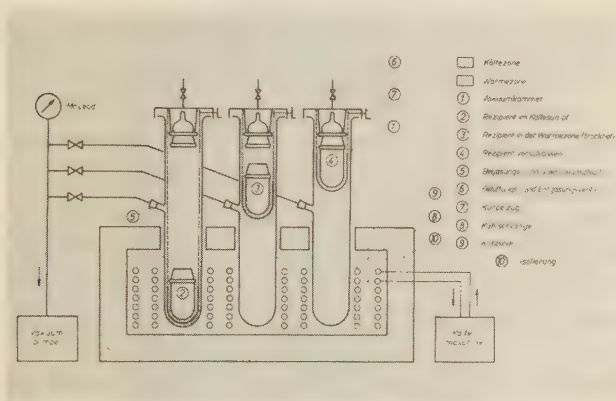


Abb. 6: Schematische Darstellung der in IV beschriebenen Gefriertrocknungsanlage.

b) Rezipienten und Verschlußmechanismus

Zur zeitlich unbegrenzten Lagerung lyophilisierten Transplantationsmaterials eignet sich eine Verpackung unter Vakuum in besonderem Maße. Dies läßt sich auf verschiedenen Wegen erreichen: Glasbehälter können über einen Kapillarrohransatz direkt vom Hauptvakuum der Gefriertrocknungsanlage abgeschmolzen, oder nach Beendigung des Gefriertrocknungsvorganges im Intervall evakuiert und dann verschlossen werden.

Für die eigene Gefriertrocknungsanlage, die sowohl Lyophilisation als auch Sterilisation und Vakuumverschluß in einem Prozeß in sich vereinigen sollte, mußten geeignete Präparategläser für die Transplantate entworfen werden.

Als bester Rezipient für vielseitigen Gebrauch haben sich schließlich 130 mm (60 mm, 220 mm) lange Solidexgläser mit einem Innendurchmesser von 55 mm bewährt.

Diese Gläser besitzen jeweils einen genormten äußeren Kernschliff und dazu passende Verschlußkappen mit Mantelschliff und angeschmolzenem Kapillarrohr.

Die Verschlußkappen der Spezialpräparategläser lassen sich in die Verschlußdeckplatten der als Vakuumkammern dienenden Glasvorlagen einspannen. Die Präparategläser selbst sind in eine Halterung eingelegt.

Über einen Kurbelzug als Hebevorrichtung können nun die Transplantate in ihren Spezialgläsern innerhalb der Vakuumkammern nach vollendeter Sterilisation zur Einfrierung in den Kältesumpf gesenkt werden (Abb.7).

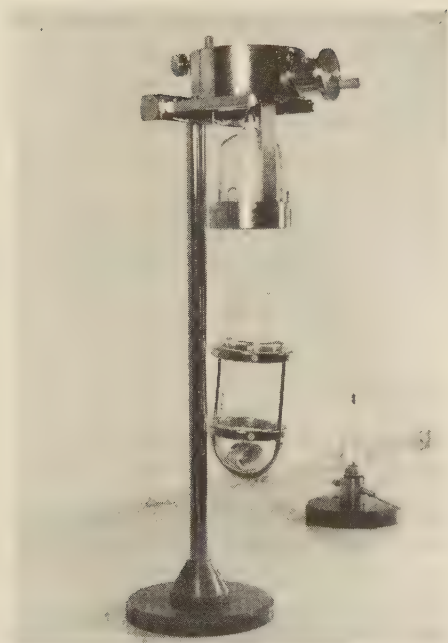


Abb. 7: Verschußdeckplatte einer Vakuumkammer mit Kurbelzug und eingelegtem Solidex-Spezial-Präparateglas mit Kernschliff und Verschußkappe mit angeschmolzenem Kapillarrohr.

Zur Trocknung werden die Präparate in die Wärmezone hochgefahren. Nach Beendigung des Lyophilisationsvorganges lassen sich durch Kurbelzug die an den Kernschliffen mit Hochvakuumfett ⁺ bestrichenen Rezipienten unter Vakuum in die Verschußkappen der Spezialgläser hineinziehen und werden durch

⁺ Hochvakuum-Fett R. Firma Leybold, Köln.
Katalognummer 1 76 41

Einströmenlassen der Atmosphäre in die Glasvorlagen (bzw. Vakuumkammern) endgültig verschlossen.

Zum Gebrauch der Transplantate wird das Vakuum innerhalb der Spezialgläser durch Abfeilen des Kapillarrohransatzes mit einer gewöhnlichen Ampullensäge gebrochen und das Glas durch Abziehen der Verschlußkappe geöffnet.

Durch erneutes Anschmelzen eines etwa 4 cm langen Kapillarstutzens sind die Spezialschliffgläser immer wieder zu benutzen.

c) Sterilisationsvorgang

Unter den zahlreichen angegebenen Methoden zur Entkeimung unsteril entnommener Transplantate, hat sich, wie erwähnt, vor allem die Äthylenoxydbegasung (COLLINS und Mitarbeiter, 23) bewährt. Aufgrund der guten Erfahrungen von PICKERING (76) bei der Herstellung von homologen Aortenklappentransplantaten unter Anwendung von Äthylenoxydgas, sollte versucht werden, den Sterilisationsvorgang derart in den Lyophilisationsprozess einzubauen, daß sekundäre Verunreinigungen nach der Sterilisation durch Manipulationen im Rahmen der Gefriertrocknung unmöglich werden. Dieses Problem ließ sich technisch auf folgende Weise lösen: Die operationsfertigen, präparierten Transplantate werden in vorsterilisierte, unverschlossene Solidexgläser eingelegt und in feuchtem Zustand in die neutrale Temperaturzone der zu diesem Zeitpunkt noch nicht unter Vakuum stehenden Glasvorlage gefahren. Unter Zwischenschalten eines thermostabilen Verdampfers wird nun jeweils die gesamte Vakuumkammer mit dem darin enthaltenen offenen,

und mit einem Transplantat beschickten Solidex-Spezial-Rezipienten über Einlaß- und Auslaßventile mit Äthylenoxyd angereichert. Nach einer Gasüberflutung des Systems mit einem Durchflußvolumen von 6 l/Min. für die Dauer von 5 Minuten werden die Ein- und Auslaßventile geschlossen.

Nach 12stündiger Einwirkung des Sterilisationsmittels werden sodann die Transplantate über den Kurbelzugmechanismus in die Tiefkühlzone zum Einfrieren hinabgefahren und der Lyophilisationsvorgang kann beginnen.

Nach Beendigung der Gefriertrocknung werden die Transplantate innerhalb der Glasvorlagen unter endgültigen, vakuumdichten Verschuß genommen. Ein Kontakt mit der Außenluft läßt sich auf diese Weise sicher vermeiden, und damit ist eine Aufrechterhaltung der Keimfreiheit im Rahmen des Gefriertrocknungsprozesses voll gewährleistet (Abb. 8).

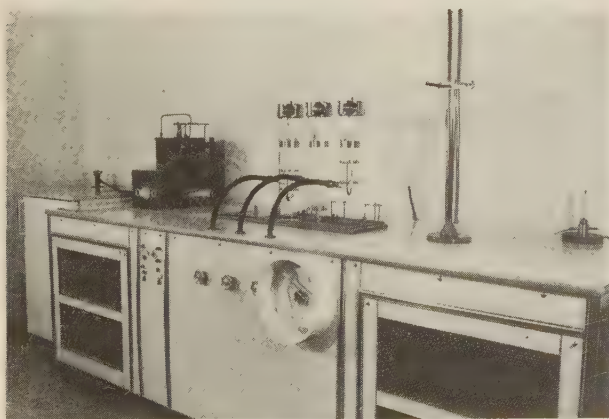


Abb. 8: Eigene Gefriertrocknungsanlage mit gekoppelter Äthylenoxydbegasungseinrichtung

Aufbau einer Herzklappenbank

Da alle durchgeführten bakteriologischen Kontrolluntersuchungen und die Bestimmungen der Restfeuchtigkeit der mit unserer Gefriertrocknungsanlage hergestellten homologen Aortenklappentransplantate sehr befriedigende Ergebnisse zeigten, haben wir nach diesem Verfahren bisher über hundert Klappentransplantate produziert und in einer sogenannten Klappenbank abgelagert. Registriert wurde das Datum der Fertigstellung der Transplantate, der Sterilitätsnachweis, die jeweilige Klappengröße und die Qualität. Durch spezielle Röntgenaufnahmen der vakuumverpackten Klappen lassen sich Spuren herdförmiger Verkalkungen bei älteren Spendern nachweisen und erlauben eine Klassifizierung in Güteklassen.

Sieben homologe Aortenklappentransplantate fanden bisher klinische Anwendung bei Patienten mit schweren kombinierten Aortenklappenvitien (Abb. 9a - d).

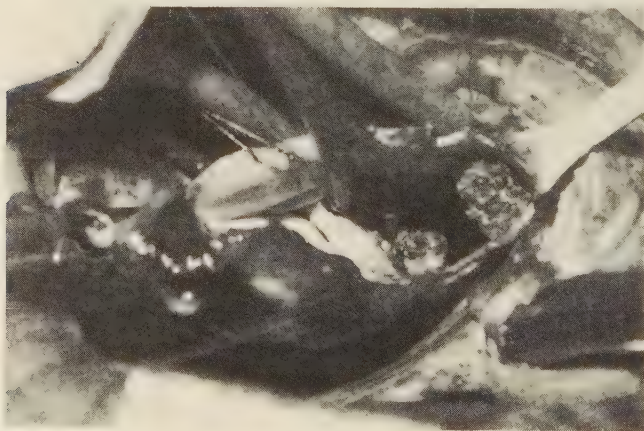


Abb. 9a: Verkalkte Aortenklappe eines 32-jährigen Patienten mit kombiniertem Aortenvitium. Operationssitus nach Anlegen der Coronarperfusion und vor Excision der erkrankten Klappe.

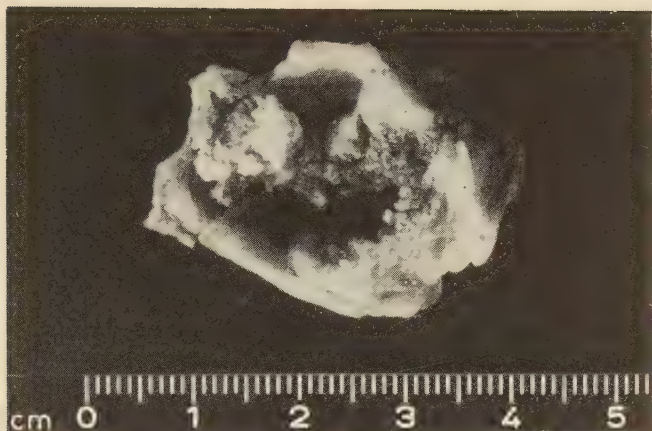


Abb. 9b: Excidierte Aortenklappe von 9a

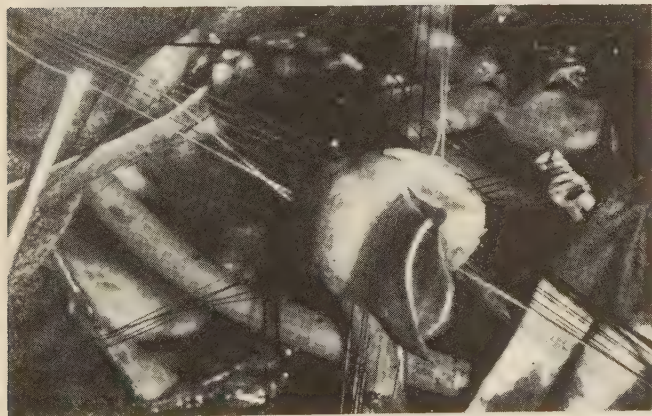


Abb. 9c: Homologes Aortenklappentransplantat während der Implantation. Operationssitus nach Anlegen der Nahtreihe der Sinus Valsalvae

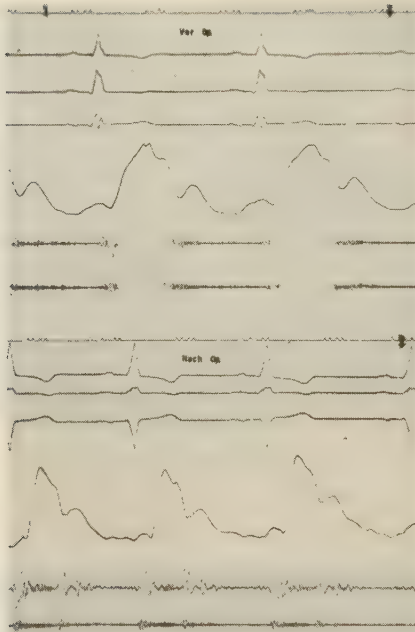


Abb. 9d: Prae- und postoperatives EKG, Carotispulskurve und Phonocardiogramm nach homologem Aortenklappenersatz.

Für den Ersatz der zerstörten Mitralklappe bieten, wie bereits erwähnt, heterologe Aortenklappentransplantate von Schwein und Kalb wesentliche Vorteile, denn sie können ohne Schwierigkeiten in unbegrenzter Anzahl gewonnen werden und besitzen meistens einen größeren Durchmesser als menschliche Klappen. Diese Voraussetzung ist wegen der häufig sehr starken Ausweitung des Annulus mitralinsuffizienter Herzen besonders wichtig.

Derartige Transplantate verlangen jedoch zur schnellen und sicheren Insertion eine vorherige Stabilisierung durch eine sogenannte Halterung.

Unter speziellen Gesichtspunkten wurde deshalb ein eigener Transplantatkäfig für die invertierte Implantation von Semilunarklappen in Vorhofposition entwickelt (Abb. 10a und b).

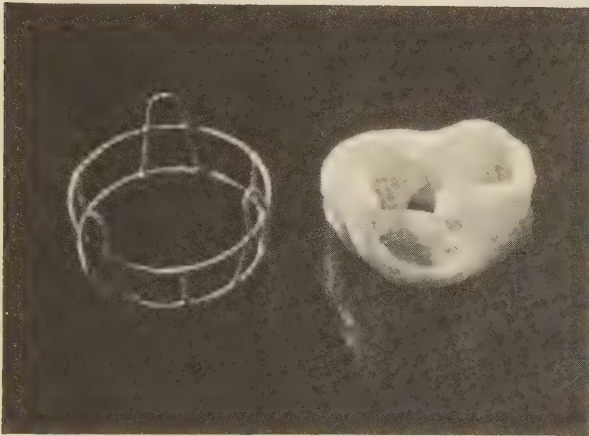


Abb. 10 a: Heterologes Kälberaortentransplantat und dazugehörige Halterung ⁺

⁺ Eingetragen als Gebrauchsmuster unter Nr. 1991636 beim Deutschen Patentamt am 14.8.1969

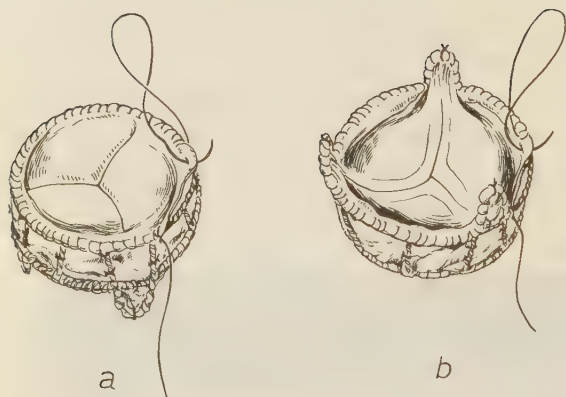


Abb. 10b: Nahttechnik zur Fixierung von Aortenklappentransplantaten in die Halterung.

Die Technik der Herstellung implantationsfertiger Aortenklappentransplantate zum Mitralklappenersatz ist in einer früheren Publikation ausführlich beschrieben (HEHRLEIN, 1969).

Da für die Konservierung tierischer Herzklappengewebe die Aufbewahrung in Cialitlösung Vorteile mit sich bringt, haben wir für unsere Klappenbank 30 heterologe : Transplantate von Schwein und Kalb mit verschiedenen Durchmessern angefertigt und feucht konserviert. Eigene klinische Erfahrungen mit diesen Ersatzventilen liegen noch nicht vor.

Zur Beurteilung der hämodynamischen Leistungsfähigkeit dieser invertiert eingenähten Semilunarklappen wurde jedoch eine Tierversuchsserie an 11 Hunden durchgeführt und soll im Folgenden beschrieben werden:

Als Versuchstiere standen 11 Bastardhunde von 20 - 25 kg Gewicht zur Verfügung. Da die Eingriffe am offenen Herzen vorgenommen werden mußten, war der Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine notwendig (IMICO-5-Pumpen-Maschine mit Bubble-Oxygenator).

Nach Barbiturateinleitung, Relaxation mit Succinyl und Intubation wurde eine normoventilatorische Beatmung mit Lachgas-Sauerstoff im Verhältnis 1:1 durchgeführt. Bedarfsweise haben wir Halothan in einer Menge von 0,5 bis 1,2 Vol.-% zugefügt. Die extrakorporalen Eingriffe erfolgten jeweils in Normothermie. Zur Füllung der Dispersionsoxygenatoren diente ein Blut-Glucose-Gemisch im Verhältnis 1:2.

Nach Freilegung des Herzens durch linksseitige Thorakotomie wurden für den extrakorporalen Bypass der rechte Ventrikel und die linke A. iliaca kanüliert. Die arterielle und venöse Druckmessung fand ihren Anschluß über die rechte A. femoralis und die V. jugularis. Heparin wurde in einer Dosierung von 1,5 mg/kg Körpergewicht verabreicht.

Nach vollständiger Excision des Mitralklappenapparates unter Mitnahme der Papillarmuskelansätze durch das eröffnete linke Herzohr, bzw. den eröffneten linken Vorhof, wurden bei allen Versuchstieren heterologe Schweineaortenklappen implantiert. Die in den Halterungen fixierten Transplantate wurden durch zwei Nahtreihen (erstens Einzelknopfnähte zwischen Annulus fibrosus der excidierten Klappe und kommissurentragendem Transplantatteil und zweitens fortlaufende Naht der Klappenbodencircumferenz an die Vorhofwand) in Mitral-Vorhof-Position verankert. Benötigte Bypasszeiten: 28 - 38 Minuten.

Diese Tierversuchsserie sollte lediglich den Nachweis eines suffizienten Klappenschlusses der vorgefertigten, feuchtkonservierten Transplantate erbringen und war nicht auf die Erzielung von Langzeitbeobachtungen ausgerichtet.

An allen Transplantaten konnte nach vollendeter Insertion am schlagenden Herzen, bei noch eröffnetem linken Vorhof, ein ungestörtes, regurgitationsfreies Klappenspiel beobachtet und durch Filmaufnahmen dokumentiert werden (Abb. 11a - 11c).

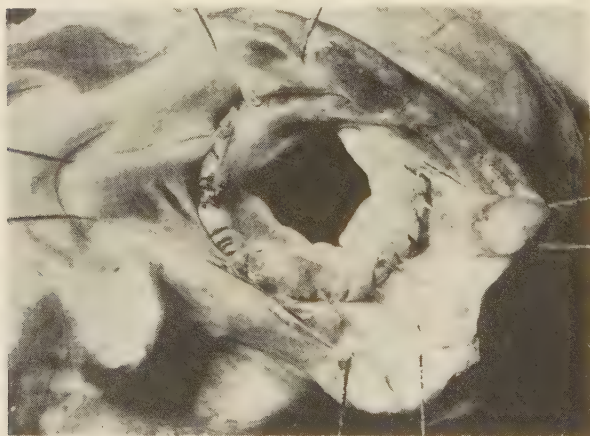


Abb. 11a: Transplantierte heterologe Schweine-aortenklappe bei einem 6 Stunden post-operationem an Verblutung verstorbenem Hund. Linker Vorhof zum Teil abgetragen. Klappe während der nachgeahmten Diastole geöffnet.



Abb. 11b: Transplantat von Fall 11a. Klappe während der nachgeahmten Systole geschlossen und frei von Regurgitation.

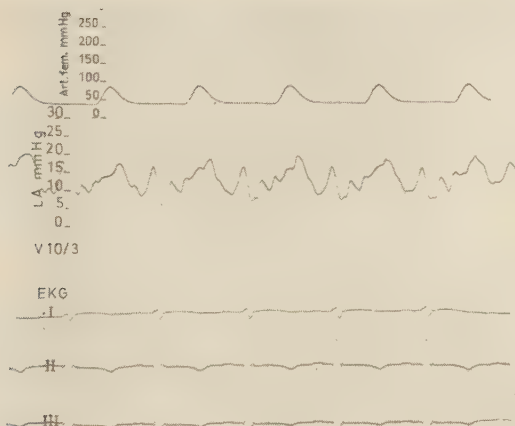


Abb. 11c: Druckkurve des linken Vorhofes nach Implantation einer Schweineaortenklappe zum Ersatz der Mitralis beim Hund.

V. Herstellung der Präparate für vergleichende Untersuchungen

Um stets dieselben Ausgangsbedingungen zu haben, wurden alle für die nachfolgenden vergleichenden Untersuchungen verwandten Präparate in einem standardisierten Herstellungsprozeß bearbeitet. Neben einer Serie homologer Transplantate wurden die Untersuchungen vorwiegend an Kälberaortenklappen gesunder, 6 Monate alter Tiere durchgeführt. Aus den unmittelbar nach der Schlachtung entnommenen Spenderherzen wurde unter Mitnahme des Taschenklappenapparates ein etwa 6 cm langer Aortenzyylinder vom umgebenden Gewebe freipräpariert und excidiert. Dieser Aortenzyylinder wurde sodann in 6 etwa gleich große Streifensegmente unterteilt und zunächst für 12 Stunden in einer Kochsalz-Heparin-Antibiotikallösung (10 000 IE Heparin und 1 g Streptomycin + 1 Mill. E. Penicillin in 500 ml physiologischer NaCl-Lösung) bei Bluteissschranktemperatur aufbewahrt.

Danach wurden die einzelnen Segmente für die verschiedenen Untersuchungen besonders nummeriert und getrennt weiterverarbeitet. Folgende Verfahren kamen zur Anwendung:

1. Einfache Lyophilisation
2. Lyophilisation in Kombination mit Äthylenoxydbegasung
3. Lyophilisation in Kombination mit Beta-propiolacton-Behandlung
4. Lyophilisation mit nachfolgender Gammastrahlen-Sterilisation
5. Feuchtkonservierung für die Dauer von 28 Tagen in äquilibrter Cialitlösung
6. Ein weiteres Aortenklappensegment wurde jeweils als Kontrollpräparat unbehandelt zurückbehalten.

Für die klinische Anwendung der Transplantate bieten die ausgewählten Sterilisationsmittel eine durch zahlreiche Literaturangaben bewiesene ausreichende Sicherheit der Entkeimung. Eigene Kontrolluntersuchungen ergaben immer die gewünschte Keimfreiheit.

VI. Morphologische Untersuchungen

1. Methodik

Zur Beurteilung feingeweblicher Strukturveränderungen nach Anwendung verschiedener Sterilisationsverfahren wurden die Semilunarklappen von 10 sechs Monate alten Kälbern und 4 homologe Aortenklappen untersucht.

Nach 12-stündiger Aufbewahrung der in 6 Segmenten unterteilten Semilunarklappen eines jeden Kälberherzens in Kochsalz-Heparin-Antibiotikallösung wurden die einzelnen Segmente wie folgt typisiert:

- H S N : Natives Kontrollpräparat.
Sofortiges Einlegen in gepufferte Formalinlösung nach LILLIE (56).
- H S L : Reines Lyophilisationspräparat.
Gefriertrocknung in der unter Kapitel IV beschriebenen Anlage und Aufbewahrung bis zur Untersuchung in vakuumdicht verschlossenen Solidex-Spezialgläsern.
- H S L Ä : Kombinationspräparat.
Nach 12-stündiger Äthylenoxydbegasung Gefriertrocknung und Aufbewahrung unter Vakuumverschluß, wie in Kapitel IV beschrieben.
- H S L β : Kombinationspräparat.
Einlegen in eine 1%ige Beta-propiolacton-Lösung für die Dauer von 1 Stunde und danach Gefriertrocknung und Verschluß unter Vakuum.
- H S L γ : Kombinationspräparat.
Nach Gefriertrocknung und Verschluß unter Vakuum in einem Solidex-Spezialglas Gammabestrahlung mit einer Gesamtdosis von 2,5 Mrad.

H S C : Nach 24-stündiger Aufbewahrung in der von CARPENTIER (20) angegebenen Mutterlösung I Konservierung in gepuffelter Cialitlösung für 28 Tage.

Die unter diesen verschiedenen Konservierungs- und Sterilisierungsarten behandelten Präparate wurden dann nach 4 Wochen dauernder Aufbewahrungszeit in neutralem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach Anfertigung 7 μ dicker Schnitte wurden insgesamt 240 Präparate mit Hämatoxylin-Eosin, nach van GIESON und mit Alzian-Blau gefärbt und histologisch untersucht.

Um die bei der mikroskopischen Untersuchung infolge der verschiedenen Vorbehandlung aufgetretenen und nachgewiesenen Gewebesauflockerungen zu objektivieren, wurden von den histologischen Präparaten der Herzklappensegmente photographische Aufnahmen angefertigt. Dazu wurde das Gewebe von jeweils 5 Kälbern verwendet. Von jedem Schnitt wurden 5 Negative hergestellt und die Anzahl der Zellen, bzw. Zellkerne ausgezählt, so daß pro Konservierungsverfahren 25 Flächenauszahlungen zur Verfügung standen.

Als Flächeneinheit diente die Größe des Negativs (24 x 36 mm).

2. Ergebnisse

a) vergleichende mikroskopische Schnitte:

Bei mikroskopischer Untersuchung der verschieden vorbehandelten Herzklappenpräparate ist zunächst

zu erkennen, daß die einzelnen Sterilisations- und Konservierungsverfahren eine unterschiedlich starke Auflockerung der Bindegewebsstruktur des Herzklappengewebes bewirken.

Das Aortenklappengewebe besteht aus mehreren Bindegewebsschichten und besitzt elastische Fasernetze, jedoch keine Muskelfasern. Das eigentliche bindegewebige Skelett der Taschenklappen inponiert als eine Platte dicht gefügter Kollagenfaserbündel, an die sich eine locker strukturierte Bindegewebsschicht anschließt. Unter dem Endothel der Gegenseite findet sich eine dickere Verschiebeschicht mit elastischem Fasernetz. So sieht man im histologischen Bild der unbehandelten Aortenklappe eines 6 Monate alten Kalbes eine gleichmäßige Anordnung der Kollagenfaserbündel mit regelmäßiger architektonischer Struktur und dicht beieinander liegenden Bindegewebszellen (Abb. 12).

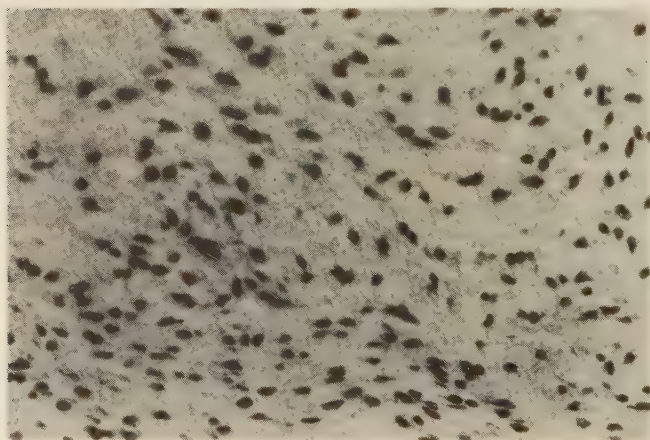


Abb. 12: Präparat 6 H S N . Aortenklappengewebe eines 6 Monate alten Kalbes. Keine Vorbehandlung. H - E - Färbung. Vergrößerung 315fach.

Das ohne sonstige Sterilisationsmaßnahmen, lediglich lyophilisierte Herzklappengewebe zeigt ebenfalls einen überwiegend normalen Aufbau und eine noch ebenmäßige Ausrichtung der Faserstrukturen. Nur an vereinzelten Stellen wird eine geringe Dissoziation der kollagenen Fasern sichtbar. Die Zellkerne liegen nicht ganz so dicht beieinander wie im unbehandelten nativen Kontrollpräparat (Abb. 13).

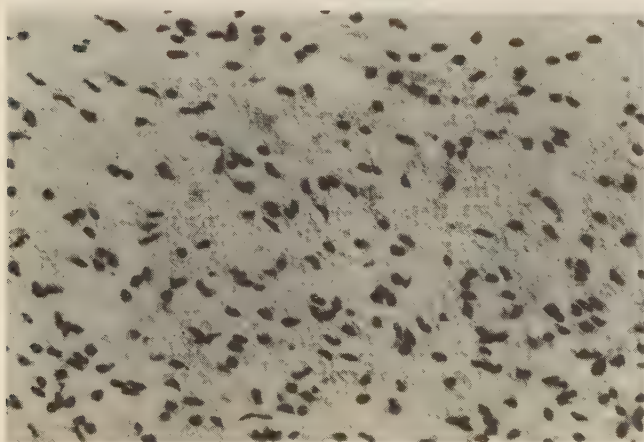


Abb. 13: Präparat 11 H S L . Aortenklappengewebe eines 6 Monate alten Kalbes nach Lyophilisation.

H - E - Färbung. Vergrößerung 315fach.

Nach 4 Wochen langer Aufbewahrung in äquilibrierter Cialitlösung lassen sich an den Aortenklappenpräparaten der Kälberherzen herdförmige Auflockerungen der Kollagenfaserbündel erkennen. Dementsprechend erscheint auch die Anzahl der Zellkerne pro Flächeneinheit geringer (Abb. 14).

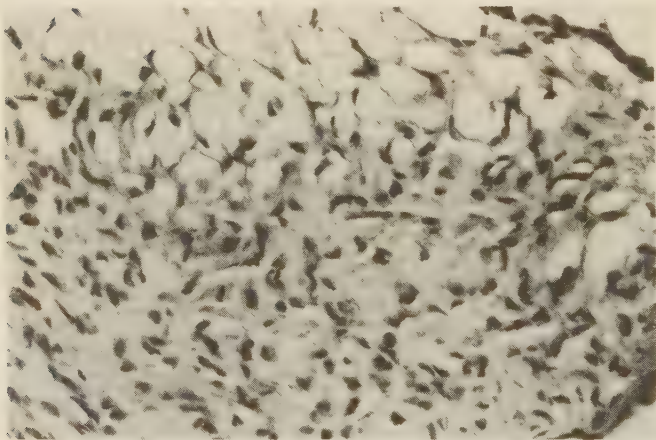


Abb. 14: Präparat 4 H S C . Aortenklappen-
gewebe eines 6 Monate alten Kalbes
nach 4 Wochen langer Einwirkung von
Cialitlösung.
H - E - Färbung. Vergrößerung 315fach.

Eine wesentlich stärkere Strukturveränderung des Herzklappengewebes findet sich bei der Lyophilisation mit vorausgegangener Sterilisation durch Einlegen in 1%ige Beta-propionlacton-Lösung für die Dauer von 1 Stunde. Man erkennt zwischen den Kollagenfaserbündeln meist zystische, stellenweise auch spaltförmige Hohlräume (Abb. 15).

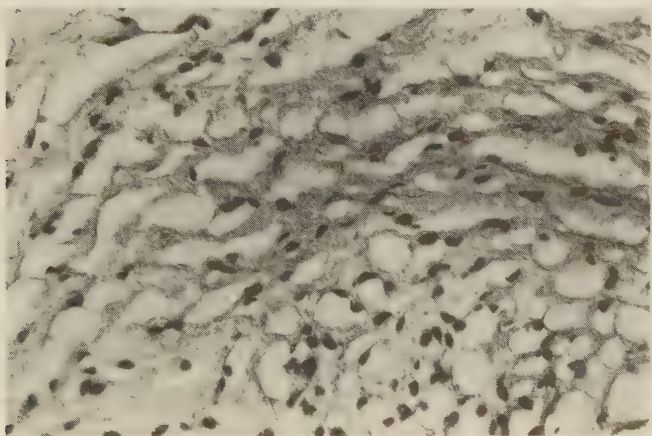


Abb. 15: Präparat H S L β . Aortenklappengewebe eines 6 Monate alten Kalbes nach 1stündiger Behandlung mit 1%iger Beta-propionlacton-Lösung und anschließender Lyophilisation. H - E - Färbung. Vergrößerung 315fach.

Eine grobe zystische Auflockerung der Faserstruktur im histologischen Schnitt läßt sich auch nach der kombinierten Behandlung von Äthylenoxydbegasung und Lyophilisation des Herzklappengewebes nachweisen (Abb. 16).

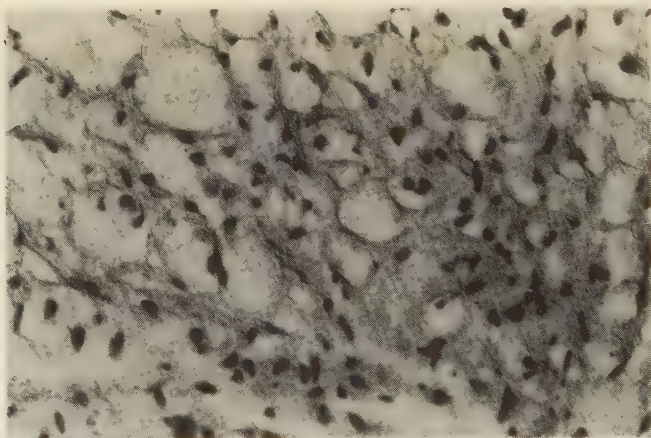


Abb. 16: Präparat 4 H S L Ä . Aortenklappen-
gewebe eines 6 Monate alten Kalbes
nach 12stündiger Äthylenoxydbegasung
und anschließender Lyophilisation.
H - E - Färbung. Vergrößerung 315fach.

Die stärksten morphologisch faßbaren Strukturveränderungen werden durch die Gammastrahlensterilisation hervorgerufen. Das Herzklappengewebe besteht nur noch aus schmalen Faserzügen, zwischen denen große, zystische Hohlräume liegen. Die noch vorhandenen Bindegewebszellen sind dementsprechend weit auseinandergedrängt (Abb.17).

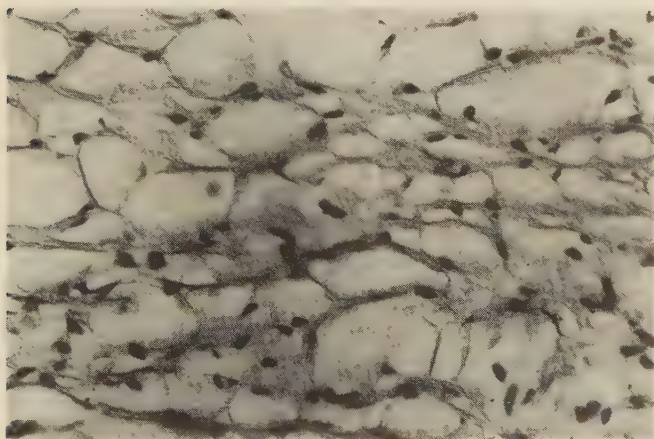


Abb. 17: Präparat 11 H S L : Aortenklappen-
gewebe eines 6 Monate alten Kalbes
nach Lyophilisation und Gammastrahlen-
sterilisation.
H - E - Färbung. Vergrößerung 315fach.

b) Zellzahlbestimmung pro Flächeneinheit

Als Parameter zur quantitativen Erfassung der histologisch nachgewiesenen Strukturveränderungen am Herzklappengewebe, insbesondere der Auflockerung des Gewebes nach Behandlung mit verschiedenen Sterilisationsverfahren, kann die Berechnung der Zellzahl pro Flächeneinheit herangezogen werden. Je weniger Zellen sich pro Flächeneinheit ermitteln lassen, desto stärker muß die Auflockerung des Gewebes sein.

Durch diese Methode ist es möglich, auch relativ geringe Veränderungen zu erfassen. Es gelingt damit, dezente Unterschiede zu objektivieren, wie sie beispielsweise nach der mikroskopischen Struktur beim Vergleich von normalem und lyophilisiertem Herzklappengewebe nur vermutet werden können (Einzelwerte siehe Anhang, Seite 73-75).

Die Ergebnisse der Zellzahlberechnung, sowie die prozentuale Flächenzunahme als Äquivalent für die Auflockerung des Gewebes für die verschieden vorbehandelten Aortenklappen-segmente, sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Verfahren	Anzahl der Zellkerne pro Flächeneinheit (24x36 mm) bei 106 facher Vergrößerung	Flächenzunahme in % (Äquivalent der Auflockerung des Gewebes)
Unbehandelt (normales Herzklappengewebe)	113,0	---
Herzklappengewebe nach Lyophilisation	104,2	7,8
Cialit-Behandlung	96,3	14,8
Lyophilisation + Betapropiolacton- Behandlung	87,9	22,2
Lyophilisation + Äthylenoxydbegasung	82,4	27,1
Lyophilisation + Gamma Strahlenbehandlung	75,2	33,5

Tab. 1: Zellzahlbestimmung pro Flächeneinheit
im Herzklappengewebe nach Anwendung
verschiedener Sterilisationsverfahren.

Zur besseren Illustration wurden die Mittelwerte der 25 Flächenauszählungen in Form von Säulendiagrammen dargestellt, wobei die Werte der verschieden vorbehandelten Herzklappengewebe auf die Zellzahl des unbehandelten Herzklappengewebes (N) als 100%-Wert bezogen wurden (Abb. 18).

Die Tendenz der einsetzenden Gewebsveränderungen geht hieraus deutlich hervor.

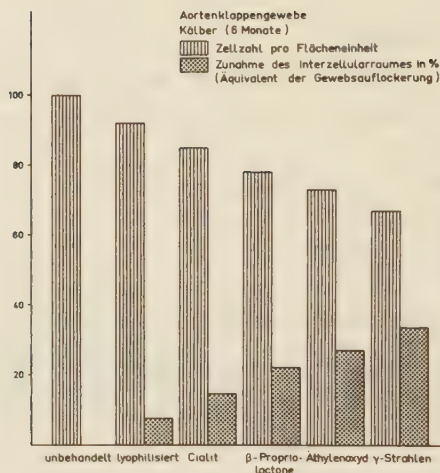


Abb. 18: Zellzahl des verschieden vorbehandelten Herzklappengewebes pro Flächeneinheit, bezogen auf die Zellzahl des unbehandelten Gewebes als 100%-Wert und prozentuale Zunahme des Interzellularraumes.

Aufgrund der Meßwerte läßt sich eine gute Übereinstimmung der durch die Zellzahlbestimmung nachgewiesenen Strukturveränderungen mit den bereits mikroskopisch festgestellten Gewebsveränderungen ermitteln.

VII. Das Verhalten heterologer Aortenklappentransplantate
nach ektooper Implantation in den tierischen Organismus

Um Hinweise auf eine evtl. verschiedene Reaktionsweise des lebenden Organismus nach Implantation von heterologen Aortenklappengeweben, die eine differente Vorbehandlung erfahren haben, zu bekommen, wurden 2 Tierversuchsreihen durchgeführt.

M e t h o d i k :

Aus 12 Kälberherzen wurden unmittelbar nach der Schlachtung die Aortenklappensegel excidiert, jeweils in 6 Segmente unterteilt und sodann, wie in dem vorangegangenen Kapitel beschrieben, getrennt weiterverarbeitet.

Das jeweils als Kontrollpräparat dienende Segment 1 wurde ohne Konservierungsmaßnahmen bis zur Implantation in einer Tiefkühltruhe bei -40 Grad Celsius aufbewahrt. Zur Registrierung wurden die einzelnen Spenderherzen fortlaufend nummeriert und die einzelnen Sterilisationsverfahren durch Abkürzungen typisiert, so daß sich folgender Schlüssel-aufstellen ließ:

- 1 H B N = Aortenklappensegel aus Herz 1, aufbewahrt als Nativpräparat in Tiefkühlung
- 1 H B L = Aortenklappensegel aus Herz 1, lyophilisiert und in sterilem Solidexglas unter Vakuum aufbewahrt
- 2 H B L Ä = Aortenklappensegel aus Herz 2, lyophilisiert und mit Äthylenoxyd begast

- 2 H B L τ = Aortenklappensegel aus Herz 2, lyophilisiert und mit 2,5 Mrad gammastrahlensterilisiert
- 10 H B L β = Aortenklappensegel aus Herz 10, nach 1stündiger Behandlung mit Beta-propionlacton-Lösung lyophilisiert
- 12 H B C = Aortenklappensegel aus Herz 12, 4 Wochen lang in Cialitlösung aufbewahrt

a) Tierversuche - Serie I

6 männliche Kaninchen von 4 bis 5 kg Gewicht wurden nach intravenöser Gabe von 2 ml Thalamonal durch die Ohrvene von einem Mittelschnitt aus unter sterilen Kautelen laparotomiert. Die Eröffnung der Bauchhöhle erfolgte in einer Ausdehnung von 10 bis 12 cm. An der Innenfläche des Peritoneums, 3 cm rechts lateral der Linea alba, wurden bei jedem Kaninchen 6 etwa 5 x 5 mm große Gewebestücke verschieden vorbehandelter Aortenklappensegel durch atraumatische Naht fixiert. Die mit den Hauptnummern I bis VI gekennzeichneten Kaninchen erhielten das Herzklappenewebe aus den korrespondierenden Kälberherzen 1 bis 6, d.h. bei Kaninchen I wurden die Gewebepreparate 1 H B N, 1 H B L, 1 H B L Ä, 1 H B L τ , 1 H B L β und 1 H B C eingenäht. Die Transplantate wurden stets in der Reihenfolge "N-L-LÄ-L τ -L β -C" von cranial nach caudal implantiert, um späteren Verwechslungen vorzubeugen.

Nach Einbringen von Antibiotika-Lösung in die Bauchhöhle erfolgte der Wundschluß in Schichten (Abb. 19).



Abb. 19: Operationssitus bei ektooper Verpflanzung von heterologen Aortenklappensegeln an das Peritoneum von Kaninchen

b) Tierversuche - Serie II

Um eine immunologische Interferenz der verschieden vorbehandelten Transplantate auszuschalten, wurde eine zweite Serie von 6 Kaninchen unter gleichen Narkosebedingungen und Anwendung derselben Operationstechnik laparotomiert.

Diese Kaninchen mit den Hauptnummern VII bis XII erhielten von den Kälberherzen 7 bis 12 jeweils ein Aortenklappensegment, das der gleichen Konservierungs- bzw. Sterilisationsmethode unterworfen worden war.

Beispiel: Bei Kaninchen VII wurden die Transplantate 7 H B N, 8 H B N, 9 H B N, 10 H B N, 11 H B N, 12 H B N, bei Kaninchen VIII die Transplantate 7 H B L, 8 H B L, 9 H B L, 10 H B L usw. implantiert.

c) Entnahme der Präparate für die histologische Untersuchung

Die Kaninchen der Serien I und II wurden jeweils 28 Tage nach der Operation geopfert. Nach Abbalgen der Tiere wurden die die Transplantate tragenden Bauchwände (Muskeln und Peritoneum) in einer Ausdehnung von 15 x 5 cm excidiert. Zur Kennzeichnung der Reihenfolge der Transplantate mußte das craniale Ende der entnommenen Gewebeplatte dreieckförmig auslaufend zugeschnitten werden. Der transplantattragende Muskel - Peritoneallappen wurde sofort nach Entnahme auf eine ebenfalls dreieckförmig zugeschnittene Holzunterlage aufgespannt, numeriert und in 4%-igem neutralem, nach LILLIE (56) gepuffertem Formalin (pH 7,0) fixiert und bis zur weiteren histologischen Bearbeitung darin aufbewahrt. Vor der Einbettung in Paraffin wurde das Gewebe 24 Stunden in fließendem Leitungswasser gewässert. 7 μ dicke Schnitte, senkrecht zur Bauchwand verlaufend, wurden jeweils mit Hämatoxylin-Eosin, nach van GIESON und mit Alzianblau gefärbt.

d) Histologische Ergebnisse



Abb. 20: Nicht vorbehandeltes Aortenklappengewebe eines 6 Monate alten Kalbes, 4 Wochen nach Annähen an das Peritoneum parietale der vorderen Bauchwand eines Kaninchens. H - E - Färbung, Vergrößerung 9-fach.

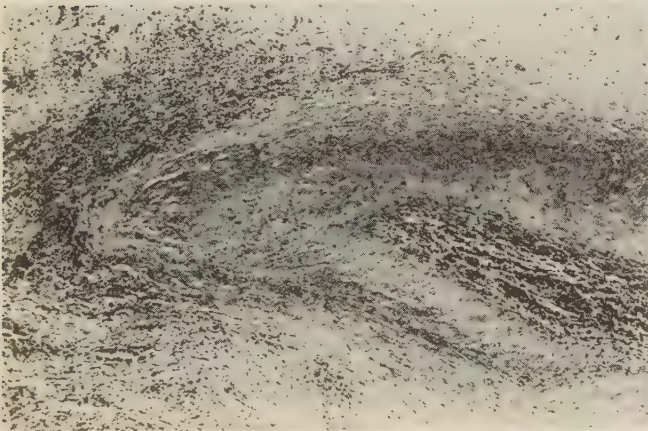


Abb. 21: Transplantationsreaktion in nicht vorbehandeltem Aortenklappengewebe. Weitgehender Abbau der Semilunarklappe. H - E - Färbung, Vergrößerung 55-fach.

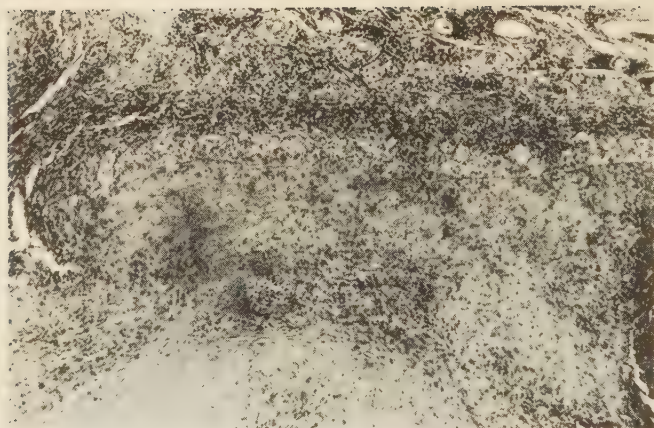


Abb. 22: Transplantationsreaktion in lyophilisiertem Aortenklappengewebe:

Unten: Reste nekrotischen Transplantatgewebes
Mitte: Saum von Histiocyten und Lymphocyten
Oben: Um kleine Venolen angeordnete Lymphocyten

H - E - Färbung, Vergrößerung 55-fach.

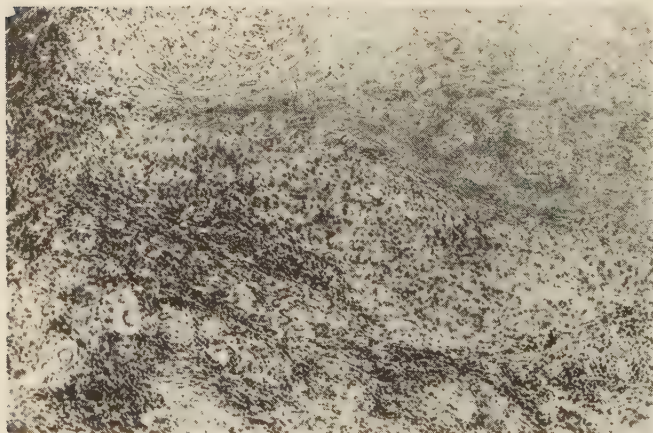


Abb. 23: Transplantiertes lyophilisiertes Aortenklappengewebe (Heterolog, von Kalb auf Kaninchen):

- Rechts oben: Nekrotisches Bindegewebe
mit breitem Saum von Histio-
zyten, bzw. Epitheloidzellen
und Lymphozyten,
Links unten: Fremdkörperreaktion (Faden-
granulom) mit Fremdkörper-
riesenzellen

H E - Färbung, Vergrößerung 55-fach.

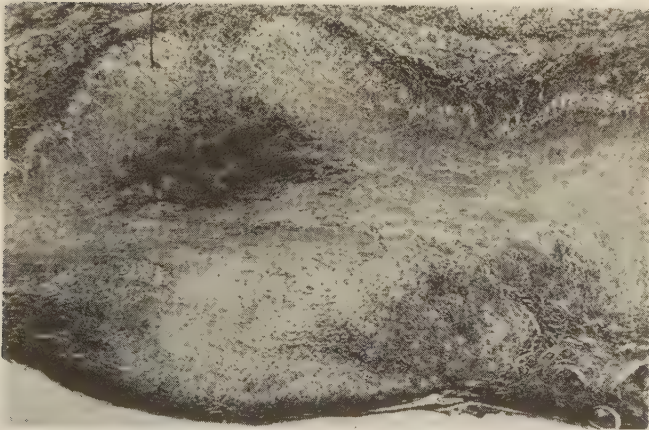


Abb. 24: Transplantiertes lyophilisiertes Aortenklappengewebe. Strukturloser, nekrotischer Gewebszerfall. Einwanderung von Epitheloidzellen in breiter Front, daran angrenzend Lymphozytenansammlungen.

H E - Färbung, Vergrößerung 35-fach.

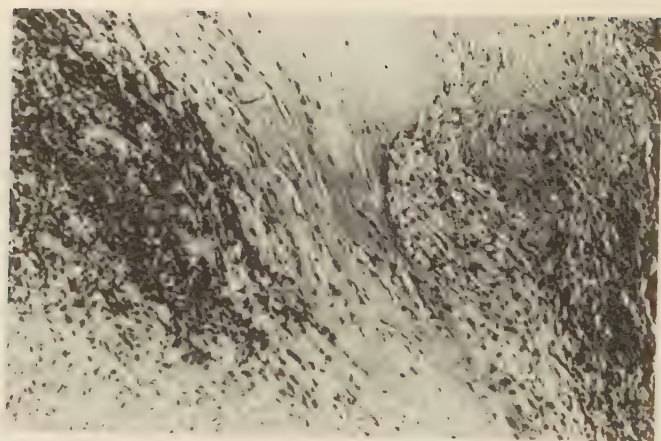


Abb. 25: Ausschnittvergrößerung von Abb. 24
Vergrößerung 88-fach

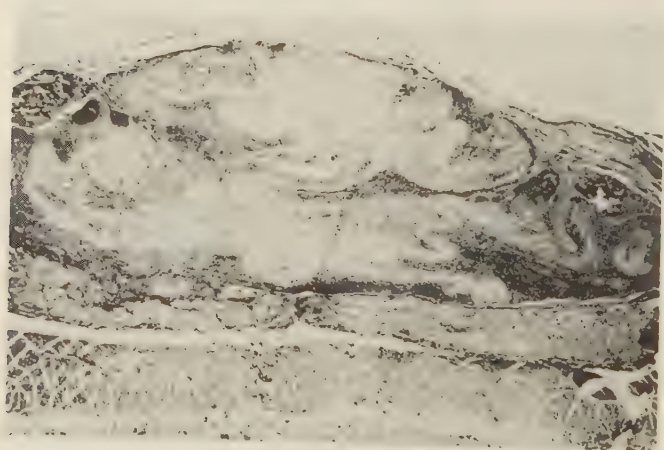


Abb. 26: Transplantationsreaktion 4 Wochen nach
Transplantation von lyophilisiertem und
Äthylenoxyd-begastem Aortenklappengewebe
(von Kalb auf Kaninchen). In beiden Rand-
bereichen Fadenmaterial mit Fremdkörper-
reaktion.

H E - Färbung, Vergrößerung 9-fach.

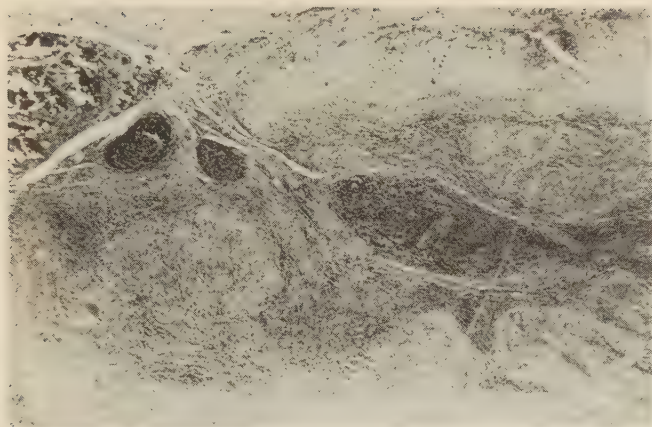


Abb. 27: Ausschnittvergrößerung von Abb. 26.

Mitte: Ausbildung von Lymphfollikeln,
Links oben: Fadengranulom.

H E - Färbung, Vergrößerung 22-fach.

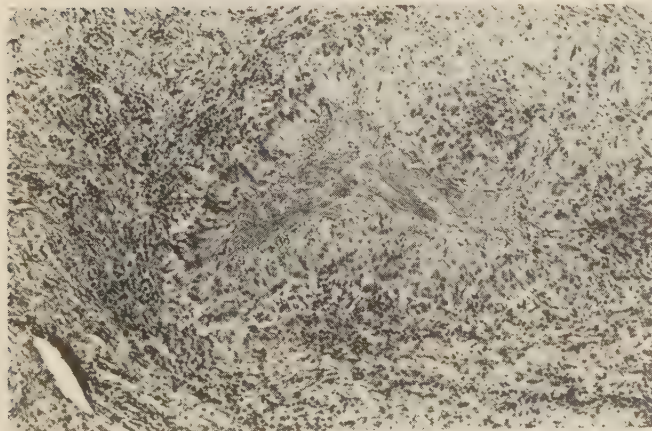


Abb. 28: Transplantationsreaktion in lyophilisiertem
und Äthylenoxyd-begastem Aortenklappengewebe.

Rest nekrotischen Herzklappengewebes mit
breitem Saum von Epiteloidzellen und da-
ran angrenzend Lymphozyten.

H E - Färbung, Vergrößerung 70-fach

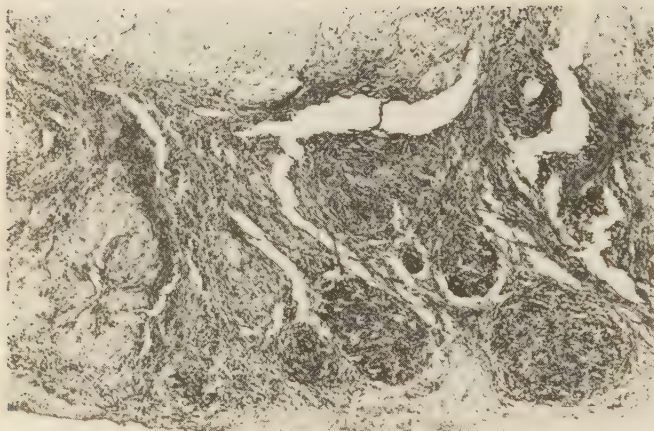


Abb. 29: Transplantationsreaktion in lyophilisiertem und Äthylenoxyd-begastem Aortenklappengewebe mit Ausbildung von Lymphfollikeln
H E - Färbung, Vergrößerung 55-fach.



Abb. 30: Lyophilisiertes und Gamma-Strahlen behandeltes Aortenklappengewebe eines 6 Monate alten Kalbes 4 Wochen nach Transplantation auf das Peritoneum eines Kaninchens.
H E - Färbung, Vergrößerung 11-fach.

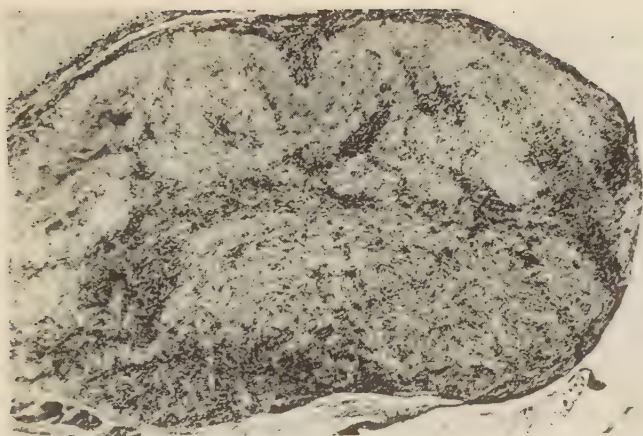


Abb. 31: Ausschnittvergrößerung von Abb. 29
Vergrößerung 28-fach.

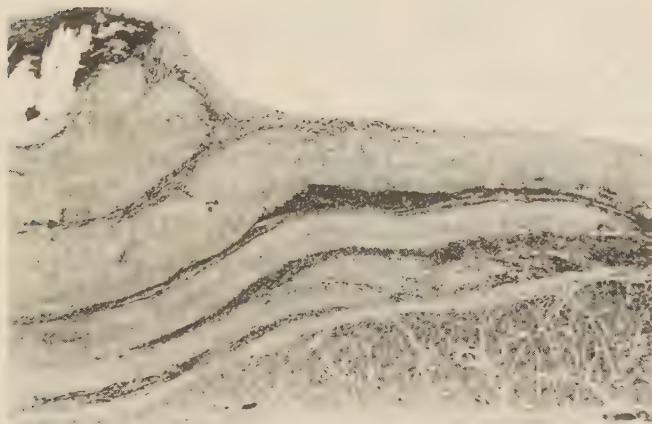


Abb. 32: Lyophilisiertes und mit Beta-propiolacton
behandeltes Aortenklappengewebe 4 Wochen
nach Transplantation.

Links oben: Fadenmaterial mit Fremd-
körperreaktion

H E - Färbung, Vergrößerung 22-fach.

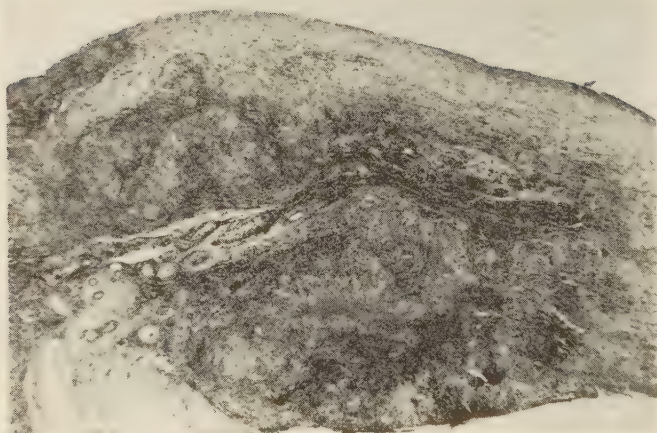


Abb. 33: In Cialit-Lösung konserviertes Aortenklappengewebe 4 Wochen nach der Transplantation.

H E - Färbung, Vergrößerung 28-fach.

Die mikroskopische Untersuchung dieser Schnitte zeigt, daß nach einer Versuchsdauer von 4 Wochen die ursprüngliche Gewebestruktur des transplantierten Kälberherzklappengewebes fast völlig aufgehoben ist. An Stelle eines normalerweise vorwiegend aus parallel ausgerichteten und leicht wellenförmig verlaufenden kollagenen Faserbündeln und Fibroblasten bestehenden Herzklappengewebes findet sich nur noch ein meist homogen eosinrotes, strukturloses Material, welches Resten nekrotischen Bindegewebes entspricht (Abb. 23). Dieses nekrotische Material wird umgeben von einem breiten Saum von Histiozyten, bzw. Epitheloidzellen, sowie von Lymphozyten und von locker eingestreuten eosinophilen Granulozyten (Abb. 21, 22, 24, 27).

Die Histiozyten, die aufgrund ihrer besonderen Phagozytoseeigenschaften als Makrophagen das nekrotische Bindegewebe abbauen, haben häufig den Charakter von saftreich erscheinenden Epitheloidzellen mit hell eosinrotem Zytoplasma und mit ovalen, katzenzungen- oder schuhsohlenförmigen Kernen mit sehr lockerer Chromatinstruktur. Diese Epitheloidzellen liegen häufig in kleinen Zellgruppen beisammen und erinnern somit an die kleinherdige Epitheloid-Reaktion, die man bei bestimmten Formen der Lymphadenitis, in Frühstadien der Lymphogranulomatose und auch bei Tumorzerfall im Lymphquellgebiet als besondere morphologische Kriterien in Lymphknoten beim Menschen nachweisen kann.

Die Lymphozyten lassen sich zunächst in dichter Anordnung um kleine postkapilläre Venolen gruppiert nachweisen (Abb. 21), aus denen sie aus der Blutbahn ins Gewebe ausgetreten sind, um von hier aus das Transplantat zu infiltrieren (Abb. 20, 21, 22 und 24). Stellenweise haben sich regelrechte Lymphfollikel ausgebildet (Abb. 26, 28).

Diese histologisch nachweisbare Transplantationsreaktion, die in ihrem morphologischen Bild beispielsweise weitgehend der Tuberkulinreaktion der Haut entspricht, stellt somit ein Immunphänomen dar, dem eine Überempfindlichkeit vom Spättyp (delayed type hypersensitivity) zugrunde liegt.

Neben dieser Transplantationsreaktion läßt sich morphologisch eine weitere Gewebsreaktion nachweisen, nämlich eine Fremdkörperreaktion auf das verwendete chirurgische Nahtmaterial, eine Gewebsreaktion, die im Rahmen der vorliegenden Problematik nur von untergeordnetem Interesse ist. In der Umgebung von Fadenmaterial findet sich hier ein zellreiches Granulationsgewebe, das durch das Auftreten von Fremdkörperriesenzellen, die im Zytoplasma Fadenbestandteile eingeschlossen haben charakterisiert ist (Abb. 22 und 26.).

VIII. Chemische Untersuchungen

Wie aus den vorangegangenen morphologischen Untersuchungen (Kap. VI) hervorgeht, treten am Herzklappengewebe bereits in Folge der zur Transplantation notwendigen Maßnahmen wie Sterilisation und Konservierung mehr oder minder eingreifende Veränderungen auf und sind leicht histologisch nachzuweisen. Die in den Präparaten deutlich sichtbare Auflockerung der Faserstruktur sagt jedoch nichts aus über eine mögliche molekulare Schädigung am Kollagen selbst. Aufgrund der immer wieder zu beobachtenden vakuoligen Degeneration, die die interfibrilläre Grundsubstanz betrifft, muß man annehmen, daß die angewandten Verfahren eine nicht unwesentliche Irritation der Polysaccharide hervorrufen.

Da morphologische Untersuchungen alleine keine Aussagekraft über die morphologische Wertigkeit der Klappentransplantate besitzen können, mußte versucht werden, durch chemische Analysen weitere Kriterien zu finden, die in der Lage sind, den Sterilisations- und konservierungsbedingten Schädigungsgrad zu erhellen.

Dazu läßt sich die Spaltbarkeit von Kollagen durch Trypsin benutzen. Während Trypsin natives Kollagen nicht angreift, wird denaturiertes Kollagen durch Trypsinspaltung löslich. Der nach Trypsineinwirkung herauslösbare Hydroxyprolingehalt kann als Maß der vorliegenden Denaturierung gewertet werden.

1. Methodik

Material und Lösungen

L (-) - Hydroxyprolin (Merck 4506)
Chloramin T (Merck 2426)
4-Dimethylaminobenzaldehyd (Merck 3057)
Perchlorsäure 4 M (durch Verdünnen aus
HClO₄ 4, 70%ig; Merck 519)

Citrat-Azetat-Puffer pH 6

50 g Zitronensäure • H₂O (Merck 244)
120 g Na-Azetat • 3 H₂O (Merck 6495)
34 g NaOH
12 ml Eisessig ad 1000 ml A. redest.

Chloramin-T. Lösung

2,88 g Chloramin T
40 ml A. redest.
100 ml Äthylenglycolmonomethyläther

Paradimethylaminobenzaldehyd

10 g Paradimethylaminobenzaldehyd in
100 ml Äthylenglycolmonomethyläther
gelöst.

1 %ige Beta-propiolacton-Lösung

= Ester der Hydroxypropionsäure in wässriger
Lösung

Cialitlösung nach CARPENTIER

Stammlösung:

24,2 g Trishydroxymethylaminomethan

23,2 g Maleinsäure, aufgefüllt auf 1000 ml

A. redest., welches vorher zur Entfernung des CO_2 zum Sieden gebracht worden ist.

Eigentliche Konservierungslösung:

250 ml Stammlösung

240 ml 0,2 N Natriumbikarbonat

0,01 g 2-Athylmercurimercapto-benzoxazol-5-karbonsaures Natrium

0,05 g Phenolrot

ad 1000 ml A.redest.

Trypsin-Puffer pH 8

100 ml Ameisensäure (Merck 264) 1 N, aufgefüllt mit Ammoniaklösung (Merck 5422) 1 N unter Rühren, bis pH 8 erreicht ist.

20 Kälber-Aortenklappen

Diese wurden nach Aufteilung in je 6 Segmente wie bei den vorangegangenen Untersuchungen mit den zu testenden Konservierungs- und Sterilisationsverfahren vorbehandelt. Die sechs Untersuchungsgruppen mit jeweils 20 Aortenklappensegmenten von jeweils gleichaltrigen Spendertieren (20 Kälber) erhielten folgende Typisierung:

- H R N₁₋₂₀ = unbehandeltes Aortenklappengewebe
- H R L₁₋₂₀ = Aortenklappengewebe nach Lyophilisation
- H R N_Ä₁₋₂₀ = Aortenklappengewebe, mit Äthylenoxyd, begast und lyophilisiert
- H R N_β₁₋₂₀ = Aortenklappengewebe nach einstündiger Behandlung mit Beta-propiolacton-Lösung und anschl. Lyophilisation
- H R N_γ₁₋₂₀ = Aortenklappengewebe, nach der Lyophilisation mit 2,5 Mrad gammastrahlensterilisiert
- H R C₁₋₂₀ = Aortenklappengewebe, nach Aufbewahrung in äquilibrierter Cialitlösung für die Dauer von 4 Wochen.

Vorgehen

Die zu untersuchenden und nach den verschiedenen Verfahren vorbehandelten Klappensegmente wurden einzeln gewogen, in feinste Stückchen zerkleinert und mit 10 mg Trypsin in 5 ml Puffer pro Klappensegment für ca. 12 Std. bei 37 Grad Celsius auf einen Magnetrührer zur Verdauung angesetzt.

Der Überstand wurde abpipettiert, der Rückstand zweimal ausgewaschen und das Waschwasser mit dem Überstand zusammen auf 10 ml aufgefüllt. Getrennt.

wurden sodann 2 ml des Überstandes und der gesamte Rückstand mit 2 ml 25%iger Salzsäure in Ampullen eingeschmolzen und zur Hydrolyse 20 Stunden bei 110 Grad Celsius im Brutschrank aufbewahrt.

Nach der Hydrolyse wurde das Hydrolysat mit Citrat-Acetat-Puffer versetzt, durch einen Autotritator ⁺ mit NaOH auf pH 6 eingestellt und auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt.

Für die mit Cialit behandelten Klappensegmente war ein zusätzlicher Arbeitsgang notwendig: Die CARPENTIER'sche Konservierungslösung besitzt einen Indikator, der es erlaubt, anhand eines Farbumschlages von orangerot in braunviolett bei längerer Konservierung beginnende autolytische Vorgänge oder eine bakterielle Kontamination frühzeitig festzustellen.

Zur Absorption dieses Phenolrot-Indikators wurden Überstand und Rückstand nach der Trypsinverdauung über eine kurze Amberlite-Ira-410-Säule (Transfusionsschlauch mit Durchmesser 3 mm, Höhe 100 mm) gegeben.

Die Absorption des gebildeten roten Farbstoffes wurde mit dem Filter Hg 578 am Eppendorf-Photometer (Firma Netheler und Hinz, Hamburg) abgelesen.

⁺ Titrator und Autoburette Radiometer Copenhagen

Je 2 ml dieses Ansatzes wurden sodann nach den Angaben von STEGEMANN (97) folgendermaßen weiter verarbeitet:

2 ml Probeansatz und 1 ml Chloramin-T-Lösung, gut schütteln und 20 Min. bei Zimmertemperatur stehen lassen.

Zugabe von 2 ml 4 M Perchlorsäure, gut schütteln und 5 Min. bei Zimmertemperatur stehen lassen.

Zugabe von 1 ml Paradimethylaminobenzaldehyd-Lösung, gut schütteln und für 15 Min. in ein Wasserbad von 60 Grad Celsius einstellen.

Abkühlen unter fließendem Wasser.

Auswertung:

Nach Erstellung einer Eichkurve mit 20 mg L (-) - Hydroxyprolin in 100 ml $n/_{1000}$ HCL wurden die Extinktionen der Proben in mg Hydroxyprolin abgelesen und entsprechend den Verdünnungen multipliziert und auf 1 g Klappeneinwage berechnet.

Das Maß der Herzkklappenschädigung errechnet sich aus dem prozentualen Anteil des Hydroxyprolins im Überstand vom Gesamthydroxyprolin.

2. Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt (Tab. 2). Hierbei bedeutet:

L = reine Lyophilisation, γ = Lyophilisation mit anschließender Gammastrahlensterilisation (2,5 Mrad), β = Lyophilisation nach vorheriger Behandlung mit Beta-propiolacton, $\ddot{A}$ = Lyophilisation nach vorheriger Äthylenoxydbegasung, C = Feuchtkonservierung in Gialitlösung.

	Nativ	L	γ	β	$\ddot{A}$	C
N	20	20	20	20	20	20
$\bar{x}$	38,73	42,54	65,62	63,27	17,20	10,60
s	6,45	10,02	10,54	13,95	7,45	5,54
p	—	n. s.	0,001	0,001	0,001	0,001

Tab. 2: Hydroxyprolingehalt des Überstandes, ausgedrückt in Prozent des Gesamthydroxyprolin des Klappensegments. Angegeben sind die Mittelwerte und Streuung der sechs verschiedenen Gruppen, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit p.

Die Unabhängigkeit der Mittelwerte der einzelnen verschieden behandelten Gruppen fand ihre Bestätigung mit der Einweg-Varianz-Analyse (Tab. 3) ⁺)

Q u e l l e	S S	d f	M S	F
Z w .	51768,169	4	12942,042	131,448 ⁺⁺⁺
i n n e r .	9353,650	95	98,457	—
T o t a l	61121,630	99	—	—

Tab. 3: Einweg-Varianz-Analyse: Angegeben sind die Summe der Quadrate (SS) zwischen und innerhalb der Gruppen, die Zahl der Freiheitsgrade (df), die mittlere Summe der Quadrate ($MS = \frac{SS}{df}$) und F ($= \frac{MS_{Zw}}{MS_{in}}$). Die Signifikanz ist hoch.

⁺) Herrn Dipl. Psych. Dr. D. Beckmann, Komm.Leiter der Abteilung für medizinische Statistik und Dokumentation, danke ich herzlich für sein Entgegenkommen bei der statistischen Sicherung der gefundenen Ergebnisse.

Tabellenanhang

N a t i v

Lyophilisation

118	108
112	105
114	101
102	98
108	101
121	106
113	104
110	99
105	107
124	102
120	109
116	100
111	102
109	104
115	108
107	101
117	109
119	103
106	109
115	108
111	101
118	105
108	109
103	107
<u>123</u>	<u>99</u>
$\bar{x} = 113$	$\bar{x} = 104,2$

Tab. 4: Einzelwerte der Zellzahlbestimmung der un-
behandelten und lyophilisierten Kälber-
aortenklappen

Tabellenanhang

C i a l i t	Beta-propiolacton u. Lyophilisation
98	85
92	91
114	93
89	81
101	82
93	87
94	90
93	95
101	92
97	89
92	83
98	81
90	92
96	85
102	90
92	80
90	85
100	95
94	94
98	92
93	89
104	83
90	91
89	92
107	81
$\bar{x} = 96,3$	$\bar{x} = 87,9$

Tab. 5: Einzelwerte der Zellzahlbestimmung der
cialit-konservierten und beta-propiolacton-
sterilisierten Kälberaortenklappen

Tabellenanhang

Äthylenoxyd u. Lyophilisation	Lyophilisation und Gammastrahlenbe- handlung
----------------------------------	--

80	79
75	76
88	69
85	72
92	82
76	77
83	75
72	70
78	67
77	80
78	84
96	78
79	70
86	69
82	73
77	79
76	77
81	80
87	71
85	74
90	82
89	80
80	71
80	77
88	67
$\bar{x} = 82,4$	$\bar{x} = 75,2$

Tab. 6: Einzelwerte der Zellzahlbestimmung der Äthylenoxydbegasten und lyophilisierten und anschließend gammastrahlensterilisierten (2,5 Mrad) Kälberaortenklappen

N	Gewicht in g	Ext. U.	Ext. R.	U in mg/ 1 g KE.	R in mg/ 1 g KE.	Ges. Hypo. mg/1 g KE.	% Ant. U.
1	,34416	,361	1,829	2,900	6,090	8,990	32,25
2	,14019	,235	1,262	5,347	9,269	14,616	36,58
3	,70909	,398	1,620	1,692	2,679	4,371	38,70
4	,40078	,311	1,637	2,178	4,731	6,909	31,52
5	,21078	,209	1,280	2,607	6,256	8,863	29,41
6	,04439	,088	,699	4,504	13,512	18,016	25,00
7	,28433	,267	1,094	2,457	3,510	5,967	41,17
8	,10664	,215	,769	5,387	6,184	11,571	46,55
9	,22474	,248	,973	2,886	7,104	7,104	40,62
10	,27772	,306	1,019	3,150	3,510	6,660	47,29
11	,07710	,361	1,293	6,998	1,253	2,251	44,33
12	,38427	,343	1,182	2,600	3,120	5,720	45,45
13	,35613	,222	1,110	1,680	2,940	4,620	30,36
14	,49051	,394	1,314	2,436	2,740	5,176	47,06
15	,54400	,298	1,118	1,601	1,921	3,522	45,45
16	,33676	,318	1,190	2,738	3,552	6,290	43,52
17	,23216	,250	1,309	3,010	5,805	8,815	34,14
18	,28979	,304	1,374	2,932	7,206	7,934	36,95
19	,20090	,318	1,378	4,597	4,509	11,803	36,94
20	,29883	,245	1,305	2,254		6,763	33,32

Tab. 7: Unbehandelte Aortenklappen. Angegeben sind Gewicht der Klappeneinwaage in Gramm, die dazugehörigen Extinktionen aus Überstand und Rückstand, die Absolutwerte des Hydroxyprolins in Überstand und Rückstand in mg berechnet auf 1 g Klappeneinwaage (unter entsprechender Berücksichtigung der Verdünnungen), der Gesamthydroxyprolin-Gehalt in mg und der Prozentanteil des Überstandes am Gesamthydroxyprolin.

L	Gewicht in g	Ext. Ü.	Ext. R.	Ü in mg/ 1 g KE.	R in mg/ 1 g KE.	Ges. Hydro. mg/1 g KE.	% Ant. Ü.
1	1,7015	,338	1,412	6,750	8,805	15,555	43,39
2	,09166	,195	1,110	5,177	13,080	18,257	28,35
3	,17187	,322	1,710	5,519	10,167	15,686	35,18
4	,26224	,441	1,655	5,238	6,667	11,905	43,99
5	,10003	,204	1,093	4,995	11,488	16,483	30,30
6	,11400	,246	1,358	5,919	12,716	18,635	31,76
7	,17479	,350	1,330	6,006	8,151	14,157	42,42
8	,19204	,453	1,529	7,280	8,502	15,782	46,12
9	,25286	,640	1,800	9,480	7,603	17,083	55,49
10	,24638	,579	1,694	8,100	7,371	15,471	52,35
11	,16981	,245	1,393	3,969	8,820	12,789	31,03
12	,13954	,219	1,533	4,296	11,635	15,931	26,96
13	,15645	,252	1,323	4,632	8,946	13,578	34,11
14	,24820	,685	1,786	10,954	7,698	18,652	58,72
15	,32064	,514	1,798	5,287	5,971	11,258	46,96
16	,19746	,455	1,311	7,590	7,084	14,674	51,72
17	,22570	,462	1,557	6,534	7,398	13,932	46,89
18	,22800	,423	1,524	5,803	7,117	12,920	44,91
19	,29592	,649	1,582	8,064	5,611	13,675	58,96
20	,13614	,349	1,333	7,340	10,459	17,799	41,23

Tab. 8: Lyophilisierte Aortenklappe. Angegeben sind Gewicht der Klappeneinwäge in Gramm, die dazugehörigen Extinktionen aus Überstand und Rückstand, die Absolutwerte des Hydroxyprolins in Überstand und Rückstand in mg berechnet auf 1 g Klappeneinwäge (unter entsprechender Berücksichtigung der Verdünnungen), der Gesamthydroxyprolingehalt in mg und der Prozentanteil des Überstandes am Gesamthydroxyprolin.

C	Gewicht in g	Ext. U.	Ext. R.	U in mg/ 1 g KE.	R in mg/ 1 g KE.	Ges. Hypro. mg/1 g KE.	% Ant. U.
1	,11147	,056	1,190	1,345	10,495	11,840	11,65
2	,18410	,045	1,132	,678	8,688	9,366	7,23
3	,38700	,091	1,431	,645	4,128	4,773	13,51
4	,03608	,033	,500	2,771	9,144	11,915	23,25
5	,09525	,038	,769	1,048	6,923	7,972	13,15
6	,09576	,082	1,236	2,088	13,363	15,451	13,51
7	,14523	,105	1,416	1,892	10,664	12,566	15,06
8	,25432	,165	2,159	1,670	10,807	12,477	13,38
9	,17167	,108	1,532	1,600	10,359	12,920	12,38
10	,15531	,081	1,366	1,286	9,002	10,288	12,50
11	,47041	,237	1,433	1,378	3,349	4,727	29,15
12	,49946	,188	1,606	1,000	3,800	4,800	20,83
13	,34790	,183	1,563	1,363	5,223	6,586	20,85
14	,69181	,273	2,008	1,404	3,600	5,004	28,05
15	,57629	,196	1,569	,778	3,157	3,935	19,77
16	,82038	,307	1,668	1,058	2,413	3,471	30,48
17	,62712	,282	1,849	1,272	3,577	4,849	26,23
18	1,71097	,396	1,905	,671	1,354	2,025	33,13
19	,92906	,366	1,606	1,150	2,033	3,183	36,12
20	,30652	,152	1,060	1,059	3,227	4,286	24,70

Tab. 9: Mit Gialit behandelte Aortenklappen. Angegeben sind Gewicht der Klappeneinwaage in Gramm, die dazugehörigen Extinktionen aus Überstand und Rückstand, die Absolutwerte des Hydroxyprolins im Überstand und Rückstand in mg berechnet auf 1 g Klappeneinwaage (unter entsprechender Berücksichtigung der Verdünnungen), der Gesamthydroxyprolingehalt in mg und der Prozentanteil des Überstandes am Gesamthydroxyprolin.

X	Gewicht in g	Ext. Ü.	Ext. R.	Ü in mg/ 1 g KE.	R in mg/ 1 g KE.	Ges. Hypro. mg/1 g KE.	% Ant. Ü.
1	08398	105	1,207	3,272	13,090	16,362	19,99
2	15495	194	1,597	3,225	12,255	15,480	20,83
3	16168	128	1,738	1,854	12,978	14,832	12,50
4	12095	138	1,596	2,684	15,694	18,378	14,60
5	04902	065	0,894	2,039	16,312	18,351	11,11
6	04045	057	0,890	2,472	19,776	22,248	11,11
7	15100	145	1,727	2,997	13,986	16,983	17,64
8	22015	184	1,846	2,270	9,988	12,258	18,51
9	15919	211	1,497	3,454	11,618	15,072	22,91
10	24300	318	1,773	3,082	8,836	11,918	25,86
11	43272	367	3,926	2,425	11,319	13,744	17,64
12	16791	172	2,348	2,975	17,850	20,825	14,28
13	19441	130	2,674	1,542	17,219	18,761	8,21
14	29953	171	3,086	1,498	12,820	14,318	10,46
15	25900	472	1,721	5,790	8,106	13,896	41,66
16	14474	213	2,026	3,795	17,250	21,045	18,03
17	26066	319	2,724	3,255	13,213	16,468	19,76
18	22637	184	2,856	3,205	15,876	18,081	12,19
19	21534	163	2,774	1,786	13,895	15,681	11,38
20	12246	100	1,246	2,040	9,996	12,036	16,94

Tab. 10: Mit Äthylendioxyd begaste Aortenklappen. Angegeben sind Gewicht der Klappeneinwaage in Gramm, die dazugehörigen Extinktionen aus Überstand und Rückstand, die Absolutwerte des Hydroxyprolins in Überstand und Rückstand in mg berechnet auf 1 g Klappeneinwaage (unter entsprechender Berücksichtigung der Verdünnungen), der Gesamthydroxyprolingehalt in mg und der Prozentanteil des Überstandes am Gesamthydroxyprolin.

A	Gewicht in g	Ext. t.	Ext. R.	U in mg/ 1 g KE.	R in mg/ 1 g KE.	Ges. Hydro. mg/1 g KE.	% Ant. t.
1	,11573	,428	,466	11,232	2,505	13,737	81,76
2	,16660	,567	,670	11,700	3,000	14,700	79,59
3	,18218	,724	1,035	16,440	5,480	21,920	75,00
4	,27693	,789	,837	12,183	4,332	16,515	73,27
5	,06339	,295	,749	11,827	9,619	16,159	75,39
6	,11337	,337	,933	8,297	7,355	21,446	55,15
7	,07781	,262	1,178	9,637	14,649	15,652	53,10
8	,20518	,409	1,157	6,087	5,405	24,286	39,68
9	,15209	,250	1,058	4,599	6,504	11,492	52,97
10	,13070	,359	,991	8,032	6,885	11,103	41,42
11	,24715	,781	1,248	13,130	5,130	14,917	53,84
12	,16410	,769	,959	19,183	5,237	18,260	78,55
13	,24995	1,008	1,302	20,000	5,400	24,420	78,55
14	,12677	,323	,809	7,289	6,107	25,400	78,74
15	,74129	,600	1,020	2,881	1,252	4,133	69,71
16	,28343	,625	1,123	8,096	3,766	11,862	68,25
17	,25612	,741	1,222	10,725	4,173	14,894	71,99
18	,28377	,569	1,387	6,864	5,209	12,073	56,84
19	,18282	,483	1,104	8,190	5,460	13,650	60,00
20	,11754	,363	,817	9,137	5,907	15,044	60,74

Tab. 11: Beta-propiolacton-Behandlung. Angegeben sind Gewicht der Klappeneinwaage in Gramm, die dazugehörigen Extinktionen aus Überstand und Rückstand, die Absolutwerte des Hydroxypro-
lins in Überstand und Rückstand in mg berechnet auf 1 g Klappeneinwaage (unter entsprechender
Berücksichtigung der Verdünnungen), der Gesamthydroxyprollingehalt in mg und der Prozentanteil
des Überstandes am Gesamthydroxyprolin.

γ	Gewicht in g	Ext. Ü.	Ext. R.	Ü in mg/ 1 g KE.	R in mg/ 1 g KE.	Ges.Hydro. mg/1 g KE.	% Ant. Ü.
1	,05522	,177	,366	,814	,398	1,212	67,16
2	,09203	,293	,828	9,231	7,602	16,833	54,83
3	,11658	,328	,829	7,713	5,999	13,712	56,25
4	,12654	,381	,967	8,097	6,794	14,891	54,37
5	,06844	,200	,387	8,035	3,068	11,103	72,36
6	,09061	,244	,571	6,618	4,301	10,919	60,60
7	,14204	,438	,975	7,920	6,336	14,256	55,55
8	,14500	,404	1,368	7,579	9,990	17,569	43,13
9	,11184	,288	,838	7,152	6,481	13,633	52,46
10	,16433	,507	1,073	9,576	6,080	15,656	61,16
11	,28042	,840	1,044	13,350	3,417	16,767	79,62
12	,24235	,571	,875	7,519	3,131	10,650	70,60
13	,13636	,590	,541	15,759	2,602	18,361	85,82
14	,28937	,767	1,055	10,695	3,450	14,145	75,60
15	,36930	,757	1,197	8,302	3,240	11,542	71,92
16	,54132	,849	1,578	6,900	3,404	10,304	66,96
17	,12000	,581	1,016	16,660	8,330	24,990	66,66
18	,26000	,714	1,051	10,560	3,801	14,361	73,53
19	,29739	,632	1,044	7,560	3,225	10,785	70,09
20	,03848	,351	,545	25,980	9,222	35,202	73,80

Tab. 12: Gamma sterilisierte Aortenklappen. Angegeben sind Gewicht der Klappeneinwaage in Gramm, die dazugehörigen Extinktionen aus Überstand und Rückstand, die Absolutwerte des Hydroxyprolins in Überstand und Rückstand in mg berechnet auf 1 g Klappeneinwaage (unter entsprechender Berücksichtigung der Verdünnungen), der Gesamthydroxyprolingehalt in mg und der Prozentanteil des Überstandes am Gesamthydroxyprolin.

IX. Diskussion

In der Beurteilung konservierungsbedingter Schädigungen an den zu Transplantationszwecken besonders geeigneten kollagenen Geweben (Dura, Herzklappen) finden sich in der Literatur nur wenig einheitliche Auffassungen. Die zum Teil oft gegensätzlichen Meinungen kommen dadurch zustande, daß bisher an kollagenem Transplantationsmaterial vorwiegend nur Einzeluntersuchungen und diese jeweils unter einem einseitigen Aspekt durchgeführt worden sind. Die Verschiedenartigkeit der hierbei angewandten Untersuchungsmethoden lassen vergleichende Aussagen nicht zu. So läßt sich z.B. aus dem Nachweis einer morphologisch-strukturellen Integrität des Gewebes nach Lyophilisation einerseits (CREECH, 25) und einer nur unbedeutenden Veränderung der Zug- und Reißfestigkeit nach Gammabestrahlung eines nur tiefgefrorenen Präparates andererseits (MALM, 62) nicht ableiten, wie sich ein Transplantat verhält, welches gefriergetrocknet und gammastrahlensterilisiert worden ist.

Lord BROCK (60) hat erst vor kurzem die Notwendigkeit hervorgehoben, die bisher gebräuchlichen Methoden der Transplantatkonservierung einer kritischen Analyse zu unterziehen, um zu sehen, ob nicht eine Abänderung der Präparations- und Aufbewahrungstechnik dringend geboten sei. Aus seinem Bericht über Spätveränderungen an segmentalen Aortentransplantaten im Hinblick auf Verkalkungserscheinungen geht eindeutig hervor, daß "frische" Aortentransplantate signifikant weniger Spätverkalkungen zeigen, als beispielsweise "gefriergetrocknete" Aortentransplantate. Dem gegenüber bevorzugen nach wie vor

ROSS und BARRAT-BOYES die Lyophilisation zur Konservierung homologer Aortenklappentransplantate.

Bisherige Untersuchungen an kollagenem Transplantationsmaterial, insbesondere an homologen und heterologen Aortenklappentransplantaten, haben sich vorwiegend darauf beschränkt, nur morphologische Veränderungen nach Konservierungsprozessen zu beurteilen. Vergleichende biochemische Untersuchungen zur Determinierung konservierungsbedingter Kollagenschädigungen sind am Herzklappengewebe bislang noch nicht durchgeführt worden.

Nochmals hervorzuheben ist, daß die Entnahme und präparatorische Arbeit bei der Herstellung von Herzklappentransplantaten nur schwer unter völlig aseptischen Bedingungen stattfinden kann, so daß für die Langzeitaufbewahrung in den meisten Fällen sowohl Konservierungsmaßnahmen als auch Sterilisationsprozesse notwendig sind. Genaue Analysen von Transplantatveränderungen verlangen, daß man sich nicht damit begnügt, die Einwirkung eines Konservierungsmittels ohne Einbeziehung der Sterilisation oder die Einwirkung eines Sterilisationsmittels ohne Berücksichtigung der zusätzlichen Konservierungsmaßnahmen am Herzklappengewebe zu überprüfen.

So haben beispielsweise STUTTE, BERNHARD und THIELE (98) durch eingehende Untersuchungen nachweisen können, daß unter Einhaltung einer bestimmten Gefriertrocknungstechnik Gewebeschädigungen im histologischen Bild in geringerem Maße auftreten. Hinsichtlich der Strukturhaltung der von STUTTE und Mitarbeitern bearbeiteten

homologen und heterologen Aortenklappen führt die Gefriertrocknung bei Gefrierstufen von minus 40 Grad Celsius und Anwendung von Schutzagenzien sowie bei Gefrierstufen von minus 75 Grad Celsius ohne Schutzlösung, wie wir sie in der eigenen Gefriertrocknungsanlage anwenden, zu den besten Ergebnissen.

Die Kieler Arbeitsgruppe hat es jedoch unterlassen, die von ihnen verwandten zusätzlichen Sterilisationsverfahren (beta-propiolacton und Äthylenoxyd) in Kombination mit der Gefriertrocknung in ihre Untersuchungen einzubeziehen. Sie hat sich damit begnügt, daß beide Sterilisationsmittel in einer ersten Kontrollserie an Herzklappen, ohne daß eine anschließende Lyophilisation stattgefunden hatte, das heißt, an frischen Aortenklappen-transplantaten, keine wesentliche lichtmikroskopisch erkennbare Schädigung an der kollagenen Faserstruktur hinterlassen haben. Gerade die Kombination von Konservierungsverfahren mit einem Sterilisationsagens scheint jedoch nach den eigenen Beobachtungen in manchen Fällen eine Potenzierung der gewebeschädigenden Noxen hervorzurufen.

Als vordringliches Anliegen der eigenen, vergleichenden Untersuchungen galt zunächst die Klärung der Frage, inwieweit 5 der zur Zeit gebräuchlichsten Konservierungs- und Sterilisationsverfahren dafür verantwortlich zu machen sind, daß am Herzklappengewebe bereits während der Vorbereitung der Transplantate Schädigungen entstehen, welche die biologische Wertigkeit wesentlich herabsetzen können. Ausgangspunkt für diese Untersuchungen mußte auch hier die Beurteilung des histologischen Bildes der Herzklappentransplantate, das heißt der Einbruch in ihre morphologische Grundstruktur sein.

Es konnte dabei festgestellt werden, daß alle geprüften Verfahren zur Sterilisation von Herzklappengewebe mehr oder minder eingreifende Veränderungen im Aufbau des Bindegewebes hinterlassen. Den stärksten Effekt hat die Gammastrahlen-Behandlung. KORB, RUNGE und ARKENAU (51) haben durch ihre histologischen Untersuchungen von lyophilisierten, mit Gammastrahlen sterilisierten kollagenen Geweben an der Dura nachgewiesen, daß eine Bestrahlung bei einer Gesamtdosis von 5,0 Mrad zu erheblichen Veränderungen an der Struktur der kollagenen Fasern führen muß, die nach einer Implantation, d.h. bei Kontakt mit lebendem Gewebe besonders deutlich zutage tritt. Die Marburger Arbeitsgruppe vermutet aufgrund ihrer Studien, daß durch die Bestrahlung eine Denaturierung der Strukturproteine mit einer Lockerung des molekularen Aufbaus stattfindet, ein Vorgang der den Abbau durch körpereigene proteolytische Enzyme in hohem Maße begünstigt. Die von KORB und Mitarbeitern (51) beschriebenen Veränderungen an der Dura nach einer Bestrahlungsdosis von 5,0 Mrad zeigen eine auffallende Ähnlichkeit mit den von uns erhobenen Befunden am Herzklappengewebe, bereits nach einer Bestrahlungsdosis von 2,5 Mrad. Weniger starke, aber noch deutliche Veränderungen verursachen nach unseren Ergebnissen die Äthylenoxyd-Begasung und die Beta-propiolacton-Behandlung, jeweils in Kombination mit der Gefriertrocknung des Gewebes. Eine relativ geringe Gewebebeeinflussung scheint vom Cialit auszugehen. Kaum merkliche morphologische Veränderungen bewirkt die reine Gefriertrocknung.

Von zentraler Bedeutung für die Interpretation dieser Befunde ist die immer wieder zu beobachtende, mehr oder minder starke Zystenbildung, bzw. vakuolige Degeneration des Transplantationsmaterials.

Die Zystenbildung im Herzklappengewebe drängt die kollagenen Fasern auseinander. Das besagt, daß die Veränderungen, die zur Zystenbildung führen, an der interfibrillären Grundsubstanz angreifen. Mukopolysaccharid-Protein-Komplexe stellen den wichtigsten Bestandteil der Grundsubstanz des Bindegewebes dar. Von GARDNER wurden bereits im Jahre 1956 im Herzklappengewebe an Mukopolysacchariden die Hyaluronsäure und das Chondroitinsulfat A und C nachgewiesen (29). Durch die stark wasserbindenden Strukturbestandteile der Polysaccharide und ihre Bindungsfähigkeit für Elektrolyte erfüllen die Polysaccharid-Protein-Komplexe eine wichtige Aufgabe im Wasser- und Ionenaustausch. Sie sind damit für die Aufrechterhaltung der notwendigen Diffusionsvorgänge, besonders in den verschiedenen sogenannten "bradytrophen Geweben" verantwortlich.

Da die nachgewiesenen Strukturveränderungen des Bindegewebes vermutlich im Zusammenhang mit Veränderungen der Grundsubstanz stehen, können die dadurch hervorgerufenen Diffusionsstörungen im transplantierten Gewebe möglicherweise als Ursache für vorzeitige Verkalkungen in Frage kommen.

Aufgrund des histomorphologischen Befundes allein läßt sich keine endgültige Aussage darüber machen, inwieweit ein Sterilisations- und Konservierungsverfahren für Herzklappengewebe besonders oder nur mit Vorbehalt geeignet ist. Auch die von HARRIS, KOWALIK, MARKS und MALM (34)

durchgeführten Untersuchungen über sterilisationsbedingte mechanische Veränderungen an homologen Aortenklappentransplantaten lassen nur unsichere Rückschlüsse auf den Grad einer funktionellen Beeinflussung des Gewebes zu.

Aus diesem Grund erscheint es zweckmäßig, ja notwendig, ergänzend zu den morphologischen Untersuchungen biochemische Analysen unter gleichen Versuchsbedingungen durchzuführen und die hierbei erhobenen Befunde mit den Ergebnissen der Morphologie und Histometrie zu korrelieren.

Das kollagene Bindegewebe besteht zu 65 % aus Wasser, 30 % aus Kollagen, zu etwa 2 % aus Elastin, 1,5 % aus Mukopolysacchariden und wenig anderen Proteinen. Das Kollagen selbst setzt sich vor allem aus den Aminosäuren Glycin (27%), Prolin (15%) und Hydroxyprolin (14%) zusammen. Daneben enthält es wenig Alanin (9,5%) und Valin (3%) sowie Hydroxylysin (1,5%) (RAPOPORT, 79). Hydroxyprolin und Hydroxylysin kommen fast nur im Kollagen vor. Das kollagene Fasergewebe ist durch seinen Gehalt an Hydroxyprolin gewissermaßen biologisch markiert. Somit eignet sich Hydroxyprolin als zuverlässiger Indikator für das Kollagen.

Eine spezifische und relativ empfindliche Nachweismethode für Hydroxyprolin besteht in der Umwandlung der Aminosäure in Pyrrol durch Decarboxylierung und Wasserabspaltung mit nachfolgender Reaktion des Pyrrols mit Paradimethylbenzaldehyd, wobei ein roter Farbstoff gebildet wird.

Darauf aufbauend haben verschiedene Autoren Methoden zur Hydroxyprolinbestimmung angegeben (NEUMANN und LOGAN, 72, STEGEMANN, 97, PROCKOP und UDENFRIEND, 78). RAUSKOLB (80) hat das Verfahren von STEGEMANN, welches nach der Literatur

heute allgemein bevorzugt wird und auf dem Nachweis von Hydroxyprolin durch Oxydation in leicht saurem Milieu beruht, systematisch auf seine Leistungsfähigkeit untersucht.

Störfaktoren in der Methodik können vor allem durch die an der chemischen Reaktion beteiligten Substanzen wirksam werden. So kann z.B. das Alter der verwendeten Chloramin-T-Lösung entscheidend die Reaktion beeinflussen, wenn das Chloramin-T nicht lichtgeschützt und kühl aufbewahrt wird. Mit einer gealterten Chloramin-T-Lösung werden zu geringe Hydroxyprolinmengen in den Untersuchungslösungen bestimmt. Weiterhin ist der Reaktionsablauf von der Konzentration der Perchlorsäure abhängig.

Unter Berücksichtigung dieser Einflüsse ist die Hydroxyprolinbestimmung mit einem Fehler von ca. $\pm 5\%$ behaftet, wobei $\pm 1 - 2\%$ auf die reine Methodik entfallen und etwa $\pm 3 - 4\%$ durch die Inhomogenität des zu untersuchenden Gewebes bedingt sind (RAUSKOLB, 80).

Natives Kollagen ist durch Verdauungsproteasen kaum angreifbar. Denaturiertes Kollagen verliert aber sein ursprüngliches molekulares Gefüge und wird durch Trypsin leicht gespalten.

Wenn man davon ausgeht, daß alle Konservierungsverfahren und Sterilisationsverfahren mit einer unterschiedlich starken Denaturierung des biologischen Materials einhergehen, so muß es möglich sein, an der unterschiedlich starken Spaltung durch Trypsin das Ausmaß der Schädigung für die einzelnen Verfahren abzulesen. Die in Kapitel VIII beschriebenen Ergebnisse der nach Trypsinverdauung in Lösung gebrachten Hydroxyprolinanteile zeigen, daß Kälberaortenklappen nach Einwirkung von 5 Vorbereitungsverfahren 2 von den nativen Klappen als Bezugswert deutlich abweichende Gruppen erkennen lassen.

Die mit Beta-propiolacton behandelten und die gammastrahlensterilisierten Klappen sind offensichtlich durch die Vorbehandlung erheblich geschädigt worden, erkenntlich am signifikant höheren Obertritt von Hydroxyprolin in den Oberstand während der Trypsin-Verdauung.

Während die Lyophilisierung allein keine zusätzliche Schädigung, verglichen mit den nativen Klappensegmenten, verursacht, läßt sich am Hydroxyprolingehalt des Oberstandes der Äthylenoxydgasbehandelten und cialit-konservierten Klappen ein signifikant geringerer Schaden an den Klappensegmenten im Vergleich zur Nativklappe ablesen. Für die Äthylenoxydbegasung könnte man als Erklärung eine intensivere Vernetzung des Kollagens anführen, die die Trypsinwirkung verdeckt. Unter Umständen spielen hier Prozesse im Sinne einer Zunahme intra- und intermolekularer, vorwiegend kovalenter Bindungen des Tropokollagenmoleküls eine Rolle, wie sie BENEKE und Mitarbeiter (9) bei ihren Untersuchungen über Altersveränderungen menschlicher Herzklappen erwähnen.

Wir können z.Zt. nicht entscheiden, ob auch bei der Cialitwirkung eine chemische Modifikation die Trypsinwirkung behindert oder verdeckt. Deutlich geht jedoch aus den vorliegenden biochemischen Analysen hervor, daß sowohl die Beta-propiolacton-Behandlung als auch in besonderem Maße die Gammastrahlensterilisation zu schweren Schädigungen am Kollagen führen. Damit dürfte nach unseren Erfahrungen der Schluß gezogen werden können, daß zumindest die beiden letztgenannten Verfahren zur Vorbehandlung von Herzklappen-transplantaten ungeeignet und abzulehnen sind.

Eine besondere Beachtung verdienen die Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen an heterologen Aortenklappentransplantaten nach Implantation in die Bauchhöhle von Kaninchen für die Dauer von 4 Wochen. Es ließ sich hierbei feststellen, daß nach Anwendung der zur Diskussion stehenden chemischen und physikalischen Behandlungsverfahren, ganz gleich welcher Art, die antigene Komponente des Bindegewebes der transplantierten Klappen bis zu einem höheren Grad erhalten blieb, als das nach den Hinweisen in der Literatur zu erwarten war (vgl. DAVIES und Mitarbeiter, 26, BINET und Mitarbeiter, 12).

Im Rahmen einer Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp geht das transplantierte heterologe Gewebe zugrunde und wird von Makrophagen des Wirtsgewebes resorbiert. Nach vollständiger Resorption des Materials setzt allmählich eine Neubildung von Bindegewebe ein. Man muß also annehmen, daß das ursprünglich transplantierte heterologe Herzklappengewebe dem Wirtsorganismus als Leitschiene dazu dient, ein neues, eigenes Klappengewebe aufzubauen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der experimentellen Untersuchungen von HIRSCH und HANKE (41) über das Verhalten von äthylenoxydsterilisierten Aortenklappengeweben in der Blutbahn. Die Frankfurter Arbeitsgruppe hat bei ihren Tierversuchen nachweisen können, daß durch eine langsame Organisation des Bindegewebes ein neues Bindegewebe entwickelt wird, das die transplantierte Form besitzt, obwohl das ursprüngliche Transplantat nicht mehr vorhanden ist.

Signifikante Unterschiede bezüglich einer verschiedenen Reaktionsweise des Organismus auf die unterschiedliche

Vorbehandlung der Transplantate dürfen von einer derartigen Versuchsserie, wie wir sie orientierend durchführten, nicht erwartet werden. Ihr Nachweis wäre Gegenstand einer speziellen Versuchsanordnung, die bei orthotoper Transplantation die Veränderungen des Gewebes in Zeitabständen von mehreren Monaten bis zu einigen Jahren analysiert.

Für die Herstellung homologer und heterologer Aortenklappentransplantate lassen sich aus den vorliegenden Untersuchungen folgende Hinweise gewinnen:

Strukturelle Veränderungen, zusammen mit nachweisbaren eingreifenden Schädigungen am Kollagenbestandteil der Herzklappen treten bei jedem der untersuchten Verfahren bereits unmittelbar nach dem Herstellungsprozeß auf. Hierbei ist das Ausmaß der Schädigung nach Lyophilisation in Kombination mit Beta-propiolacton-Behandlung und vor allem mit Gammastrahlensterilisation besonders groß. Gefriertrocknung in Kombination mit Äthylenoxydbegasung läßt sich auch heute noch vertreten. Die morphologisch und vom Biochemischen her gesehen günstigere Lyophilisation allein kann sich in der Praxis nur schwer durchsetzen, da die notwendigen Anforderungen an die Asepsis während der Transplantatgewinnung und Transplantatherstellung nicht sicher genug erfüllt werden können.

Mißt man der nach allen Verfahren nur unvollständig supprimierten immunologischen Aktivität eine größere Bedeutung für das Spätschicksal der Transplantate zu, dann bliebe als Alternative lediglich ein Konservierungsverfahren, welches eine vollständige Denaturierung und Devitalisierung bewirkt, so daß die transplantierte Herzklappe nur mehr als "Implantat" aufzufassen wäre, d.h., als ein Ventil, das mit der ursprünglichen Herzklappe nur noch die Form gemeinsam

hat. Die dann zu erwartenden Komplikationen würden zumindest in Bezug auf die Dauerbelastung jedoch bald wieder in den Problemkreis der Verschleißerscheinungen der sonst gebräuchlichen Kugel- und Linsenventilprothesen rücken.

Deshalb muß zunächst auch die jüngste Entwicklung auf dem Gebiet der Herstellung künstlicher Herzklappen, die von HUFNAGEL inaugurierte Drei-Segel-Aortenklappe aus Polypropylen-Silikon noch mit Vorbehalt betrachtet werden (45a).

Erfahrungsberichte über dieses neue Klappenmodell liegen noch nicht vor. Seine geplante Erprobung bestätigt jedoch erneut, daß von der Form her gesehen die Aortenklappe das ideale Ventil zur Aufrechterhaltung einer ungestörten Hämodynamik darstellt. Dies zeigen auch die Beobachtungen von IONESCU und Mitarbeiter (48a) mit der Fascia-lata-Klappe, wobei aus zugeschnittenen Fascienstreifen durch Einnähen in eine Halterung ein Drei-Segel-Herzklappenventil hergestellt wird.

Da bezüglich der Dauerbelastbarkeit und Vermeidung thromboembolischer Komplikationen biologisches Gewebe sich bis jetzt noch jedem Kunststoff überlegen erwiesen hat, ist jeder Beitrag zur Beurteilung der in Frage kommenden Konservierungs- und Sterilisationsverfahren kollagenen Transplantationsmaterials für die Herzchirurgie von besonderem klinischen Interesse.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen kann also sowohl die Aufbewahrung in Cialitlösung nach CARPENTIER als auch die Lyophilisation mit anschließender Äthylenoxydbegasung als brauchbares Verfahren zur Langzeitkonservierung von Herzklappen angesehen werden. Die morphologisch und biochemisch nachgewiesenen Gewebeschädigungen durch Gammabestrahlung oder Beta-propiolacton-Behandlung sollten jedoch Anlaß geben, diese beiden Sterilisations-

methoden bei der Herstellung homologer und heterologer Aortenklappentransplantate nicht anzuwenden.

X. Zusammenfassung:

Es wird über morphologische, chemische und tierexperimentelle Untersuchungen an Aortenklappentransplantaten nach Vorbehandlung mit 5 verschiedenen Konservierungs- und Sterilisationsverfahren berichtet.

Ziel der Untersuchung sollte die Feststellung sein, inwieweit an kollagenem Transplantationsmaterial infolge der Konservierungsprozesse Schädigungen entstehen, die für ein späteres Versagen der Transplantate verantwortlich gemacht werden können.

Vor allem in der Herzchirurgie ist die Klärung dieser Frage von entscheidender Bedeutung, da die Aortenklappe heute in zunehmendem Ausmaß als Ersatzventil zur chirurgischen Behandlung von Aorten- und Mitralvitien benutzt wird. Verwendet werden sowohl homologe Transplantate (vorwiegend von frisch verstorbenen Unfalltoten) als auch heterologe Transplantate (von Kalb, Schwein und Schaf).

Die Gefriertrocknung nimmt seit etwa 30 Jahren eine zentrale Stellung unter den klinisch anwendbaren Methoden der Langzeitkonservierung biologischer Gewebe ein. Aufgrund der Ergebnisse von COLLINS und FORSTER und vor allem von PICKERING scheint die Äthylenoxydbegasung für die Sterilisation von Herzklappengewebe besonders geeignet. Deshalb befaßten sich zunächst eigene Untersuchungen mit der Entwicklung einer leistungsfähigen Gefriertrocknungsanlage mit einer gekoppelten Äthylenoxydbegasungseinrichtung. Im Rahmen des Aufbaus

einer Herzklappenbank wurde eine eigene Transplantathalterung für den Mitralklappenersatz durch stabilisierte, invertiert implantierbare Semilunarklappen entworfen. Ihre Erprobung im Tierversuch wird beschrieben.

Folgende, zur Zeit gebräuchliche Vorbereitungsverfahren für die Langzeitaufbewahrung von Herzklappen wurden untersucht und ausgewertet:

1. Reine Gefriertrocknung des Gewebes bei aseptischer Verarbeitung.
2. Gefriertrocknung in Kombination mit Äthylenoxyd-
gasung.
3. Gefriertrocknung nach Gewebesterilisation mit Beta-
propiolacton.
4. Gefriertrocknung mit nachfolgender Gammabestrahlung.
5. Feuchtkonservierung durch Aufbewahrung in Cialit-
Lösung.

Morphologisch und histometrisch fanden sich nach Anwendung dieser Verfahren an Aortenklappengewebe abstufbare Schädigungen, die besonders nach Einwirkung von Gammastrahlensterilisation und Beta-propiolacton-Behandlung in Verbindung mit Lyophilisation deutlich erkennbar waren. Die Gewebsveränderungen sind durch eine zunehmende vakuolige Degeneration charakterisiert und werden dahingehend interpretiert, daß durch derartige Konservierungsprozesse eine Zerstörung der interfibrillären Grundsubstanz und zum Teil eine Aufsplitterung der Kollagenfaserbündel auftritt.

Gemessen an der Spaltbarkeit durch Trypsin (relativer Hydroxyprolingehalt in dem durch Trypsin in Lösung gebrachten Anteil) läßt sich feststellen, daß die Gammastrahlenbehandlung und die Beta-propiolacton-Behandlung am Herzklappen-

gewebe eine erhebliche Kollagenschädigung hervorrufen. Vergleichende chemische Untersuchungen dieser Art sind bisher noch nicht durchgeführt worden. Sie ergänzen die bei den morphologischen Untersuchungen erhobenen Befunde.

Eine gewisse Antigenität des heterologen Aortenklappen-
gewebes nach Implantation an das Peritoneum von Kaninchen
bleibt nach den durchgeführten tierexperimentellen Ver-
suchsserien, unabhängig vom angewandten Konservierungs-
verfahren und ohne graduelle Unterschiede nachweisbar.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen ist für die
Langzeitaufbewahrung von Herzklappengewebe die Feucht-
konservierung in Cialit-Lösung und die Lyophilisation
mit Äthylenoxydbegasung zu empfehlen. Sowohl die Beta-
propiolacton-Behandlung, als auch die Gammastrahlen-
sterilisation in Kombination mit einer Gefriertrocknung
sollten für die Konservierung von Aortenklappentrans-
plantaten keine klinische Anwendung finden.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. ALIEFF, A.: Thromembolische Komplikationen und alloplastischer Klappenersatz
Münch. med. Wschr. 110: 2270 - 2273 (1968)
2. ALLEN, J.G.: Extracorporeal Circulation
Charles C. Thomas, Springfield (1960)
3. ALTMANN, R.: Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen
Veit & Co. Leipzig (1890)
Zit. nach NEUMANN, Grundriß der Gefriertrocknung
4. ANDERSEN, M.N.,
GABRIELI, E., and
ZIZZI, J.A.: Chronic hemolysis in patients with ball-valve prosthesis
J. Thorac. and Cardiovasc. Surg. 50: 501 - 510 (1965)
5. ANGELL, W.W.,
WUERFLEIN, R.D., and
SHUMWAY, N.E.: Mitral valve replacement with the fresh aortic valve homograft: Experimental results and clinical application
Surgery 62: 807 - 813 (1967)
6. BARRAT-BOYES, B.G.: Homograft aortic incompetence and stenosis
Thorax 19: 131 - 150 (1964)
7. BARRAT-BOYES, B.G.,
LOWE, J.B., COLE, D.S.,
and KELLY, D.T.: Homograft valve replacement for aortic valve disease
Thorax 20: 495 - 504 (1965)
8. BARRAT-BOYES, B.G.: A method for preparing and inserting a homograft aortic valve
Brit. J. Surg. 52: 847 - 856 (1965)

9. BENEKE, G., SAND-
RITTER, W., SCHMITT,
W. und KULKA, R.: Altersveränderungen menschlicher
Herzklappen
Med. Welt 18: 1795 - 1802 (1967)
10. BERNHARD, A., RINGDAL,
R., BABOTAI, I., LIN-
DER, E. und KRAYENBÜHL,
H.P.: Zur Homotransplantation der Mitral-
klappe. Technik und postoperative
funktionelle Resultate
Thoraxchirurgie 13: 89 - 96 (1965)
11. BIGELOW, W.G., YAO, J.K.,
ALDRIDGE, H.E., HEIMBECKER,
R.O., and MURRAY, G.D.W.: Clinical homograft valve transplan-
tation
J. Thorac. and Cardiovasc. Surg. 48:
333 - 343 (1964)
12. BINET, J.P., CARPENTIER,
A. und LANGLOIS, J.: Heterotransplantate der Aortenklappe
Langenbecks Arch. klin. Chir. 316:
800 - 802 (1966)
13. BORNEMISZA, G.: Theoretische Probleme der Gewebekon-
servierung in Gewebekonservierung II
V E B Ver. Volk und Gesundheit,
Berlin (1965)
14. BRACKEN, A., WILTON-
DAVIES, C.C., and
WEALE, F.E.: Ethylene oxide sterilization of a
heart-lung machine
Guy's Hosp. Rep. 109: 75 - 80 (1960)
15. BRAUNWALD, N.S.,
and DETMER, Don. E.: A critical Analysis of the Status
of Prosthetic Valves and Homografts
Progr. Cardiovasc. Dis. 11: 113 - 132
(1968)
16. BRAUNWALD, N.S.,
FUCHS, J.C.A., and
BONCHEK, L.I.: Simplified insertion of aortic
homograft valves with nonthrombogenic
prosthetic frames
Surgery 63: 38 - 43 (1968)

17. BREWER, E.P.: On the limit of skin vitality
Med. Rec. 82: 483 - 484 (1882)
Zit. nach NEUMANN, Grundriß der
Gefriertrocknung

18. BÜRGER, M.: Die chemischen Lebenswandlungen des
menschlichen Herzklappengewebes
Münch. med. Wschr. 103: 1459 - 1463
(1961)

19. CARPENTIER, A.,
BLONDEAU, Ph.,
LAURENS, P., MANCEL,
D. et DUBOST, Ch.: Remplacement des valvules mitrales
et tricuspidales par des hétérogreffes
Ann. Chir. Thor. Car. 7: 33 - 38 (1968)

20. CARPENTIER, A.: Traitement des lésions valvulaires
aortique par des greffes hétéro-
plastique
R. Foulon et Co., Paris (1966)

21. CHEVRIER, J.L., SUL-
ZER, J., and LEANDRI, J.: Problems of aortic valve homografts
J. Cardiovasc. Surg. 7: 74 - 78 (1966)

22. COHN, L.H., ROBERTS,
W.C., ROCKOFF, S.D.,
and MORROW, A.G.: Bacterial Endocarditis Following
Aortic Valve Replacement
Circulation 33: 209 - 217 (1966)

23. COLLINS, H.A., and
FOSTER, J.H.: The establishment of an arterial bank
using lyophilization and ethylene
oxide sterilization
Amer. Surg. 20: 820 - 826 (1954)

24. CONWAY, H., and
STARK, R.: Zit. nach BORNEMISZA, G.
In: Gewebekonservierung II
V E B Ver. Volk und Gesundheit,
Berlin (1965)

25. CREECH, O., DeBAKEY,
M.E., COOLEY, D.A.,
and SELF, M.M.: Preparation and use of freeze-dried
arterial homografts
Ann. Surg. 140: 35 - 43 (1954)

26. DAVIES, M., LESSOF, M.M., ROBERTS, C.I., and ROSS, D.N.:
Homograft replacement of the aortic valve, Follow-up studies in 12 patients
Lancet 1: 926 - 929 (1965)
27. DURAN, C.G., and GUNNING, A.J.:
A method for placing a total homologous aortic valve in the subcoronary position
Lancet 8: 488 - 489 (1962)
28. FLOSDORF, E.W., and MUDD, S.:
Procedure and apparatus for preservation in "lyophile" form of serum and other biological substances
J. Immunol. 29: 389 - 425 (1935)
29. GARDNER, D.L.:
Pathology of the connective tissue diseases
Edward Arnold, London (1965)
30. GEHA, A.S., and TITUS, J.L.:
Fixation of aortic valve homografts with metal rings
J. Thorac. and Cardiovasc. Surg. 54: 605 - 615 (1967)
31. GIBBON, J.H.:
Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery
Minnesota Med. 37: 171 - 180 (1954)
32. GIBIAN, H.:
Mucopolysaccharide und Mucopolysaccharidasen
Franz Deuticke, Wien (1959)
33. HARKEN, D.E., SOROFF, H.S., TAYLOR, W.J., LEFEMINE, A.A., GUPTA, S.K., and LUNZER, S.:
Partial and complete prosthesis in aortic insufficiency
J. Thorac. and Cardiovasc. Surg. 40: 744 - 762 (1960)

34. HARRIS, P.D., KOWALIK, A.T.W., MARKS, J.A., and MALL, J.R.:
Factors modifying aortic homograft structure and function
Surgery 63: 45 - 52 (1968)
35. HARTMANN, F.W., LOGRIPPO, G., and KELLY, A.R.:
Preparation and sterilization of blood plasma
Am. J. Clin. Path. 24: 339 - 348 (1954)
36. HAWK, W.A., and HUMPHRIES, A.W.:
Observations on arterial homografts with special reference to pathologic changes
Cleveland Clinic Quart. 24: 26 - 40 (1957)
37. HEHRLEIN, F.W.:
Die Herstellung homologer und heterologer Herzklappentransplantate mit einer verbesserten Getriertrocknungsanlage
Langenbecks Arch. klin. Chir. 318: 202 - 208 (1967)
38. HEHRLEIN, F.W.:
Eine Halterung für Aortenklappen-transplantate zum homologen und heterologen Ersatz der Mitralis
Langenbecks Arch. klin. Chir. 324: 154 - 164 (1969)
39. HEHRLEIN, F.W., SCHLITT, W. und PAPASTAVROU, N.:
Morphologische Untersuchungen an heterologen Herzklappentransplantaten unter verschiedenen Sterilisationsbedingungen
Thoraxchirurgie 17: 244 - 251 (1969)
40. McHENRY, M.M., SMOLOFF, E.A., and HATTERSLEY, P.G.:
Complications of Heart Valve Replacement.
Embolism, BLEEDING, Hemolysis
Calif. Med. 109: 1 - 8 (1968)

41. HIRSCH, H.H. und
HANKE, H.: Über das Verhalten von Äthylenoxydstes-
rilisiertem Aortenklappengewebe in der
Blutbahn
Langenbecks Arch. klin. Chir. 308:
811 - 816 (1964)
42. HUBKA, M., SISK, K.,
BROZMAN, M., and
HOLEC, V.: Replacement of mitral and tricuspid
valve by mitral homograft
J. Thorac. and Cardiovasc. Surg. 51:
195 - 204 (1966)
43. HUDSON, R.E.B.: Pathology of the human aortic valve
homograft
Brit. Heart J. 28: 291 - 204 (1966)
44. HUFNAGEL, C.A., RABIL,
P.J., and REED, L.: A method for the preservation of
arterial homo- and heterografts
S. Forum 162 - 168, Philadelphia (1953)
45. HUFNAGEL, C.A., HARVEY,
W.P., RABIL, P.J. and
McDERMOTT, T.: Surgical correction of aortic
insufficiency
Surgery 35: 673 - 683 (1954)
- 45a. HUFNAGEL, C.A. and
CONRAD, P.W.: A new approach to aortic valve
replacement
Ann. of Surg. 176: 791 - 795 (1968)
46. HUI, K.K.L., KEEFER,
E.B.C., DETERLING, R.A.,
PARSHLEY, M.S., HUMPHRIES,
G.H., and GLENN, F.: Early results of experimental studies
of the action of high intensity elec-
trons on aortic homografts
S. Forum 255 - 261. Philadelphia (1951)
47. IONESCU, M.I.,
MASHOUR, Y.A.S., and
WOOLER, G.H.: Reconstructed heterograft aortic
valves for human use
Thorax 23: 221 - 229 (1968)

48. IONESCU, M.I., WOOLER, G.H., SMITH, D.R., and GRIMSHAW, V.A.: Mitral valve replacement with aortic heterografts in humans
Thorax 22: 305 - 313 (1967)
- 48a. IONESCU, M.I., ROSS, D.N., HOLDEN, M., HARGREAVES, M.D., and WOOLER, G.H.: Aortic valve replacement with autologous fascia lata.
Thorax (accepted for publication).
(1969)
49. KLUG, W.: Anwendung von homoplastischen Gewebekonserven in der Chirurgie.
Zbl. f. Chir. 36: 1333 - 1337 (1966)
50. KNUDSEN, M.: Die maximale Verdampfungsgeschwindigkeit des Quecksilbers.
Ann. Phys. 47: 697 - 708 (1945) Zit.n. NEUMANN, Grundriß der Gefriertrocknung
51. KORB, G., RUNGE, D. und ARKENAU, C.: Histologische Untersuchungen von lyophilisierten, mit Gammastrahlen sterilisierten kollagenen Geweben.
Mels.Med.Mitt. 41: 39 - 48 (1967)
52. LAM, C.R., ARAM, H.H., and MUNNELL, E.R.: An experimental study of aortic valve homografts.
J. Surg.Gyn. and Obst. 94: 129 - 135 (1952).
53. LESLIE, J.: Méthode nouvelle de produire et d'entretenir la congélation.
Ann. Chim. Phys. 78: 177 - 182 (1811)
Zit. nach NEUMANN, Grundriß der Gefriertrocknung.
54. LEUTHARDT, F.: Lehrbuch der physiologischen Chemie.
Walter de Gruyter und Co., Berlin (1957)

55. LILLEHEI, C.W., GOTT, V.L., SELLERS, R.D., HODGES, P.C., and VARCO, R.L.:
Clinical experience with retrograde perfusion of the coronary sinus for direct vision aortic valve surgery with observations upon use of elective asystole or temporary coronary ischemia.
In: ALLEN, J.G.: Extracorporeal Circulation, Springfield (1958)
56. LILLIE, R.D.:
Histopathologic technic and practical histochemistry.
McGraw-Hill Book Co., New York - Toronto - London (1954)
57. LYET, B.J.:
Effects of ultra-rapid and slow freezing and thawing on mammalian erythrocytes.
Biodynamica 6: 217 - 221 (1949) Zit.n. THOMAS, J.A. In: Survie et conservation biologique, Masson et Co., Paris (1963)
58. LoGRIPPO, G.A., OVERHULSE, P.R., SZILAGYI, D.E. and HARTMANN, F.W.:
Procedure for Sterilization of Arterial Homografts with Beta-Propiolactone.
Lab. Invest. 4: 217 - 231 (1955)
59. Lord BROCK:
XVII. Int. Kongr. Europ. Ges. für Herz- und Kreislaufchirurgie, London (1968)
60. Lord BROCK:
Long-term degenerative changes in aortic segment homografts, with particular reference to calcification.
Thorax 23: 249 - 255 (1968)
61. MACRIS, J.A., SLOAN, H., and OREBAUGH, J.E.:
The use of cobalt⁶⁰ as a sterilizing agent for aortic homografts
S. Forum 268 - 273, Philadelphia (1954)
62. MALM, J.R., BOWMANN, F.O., HARRIES, P.D. and KOVALIK, A.T.W.:
An evaluation of aortic valve homografts sterilized by electron beam energy.
J. Thorax. and Cardiovasc. Surg. 54: 471 - 477 (1967)

63. MARKS and POWELL: Zit. nach CARPENTIER
In: Traitement des lésions valvulaires aortique par des greffes hétéroplastiques.
R. Foulon et Co., Paris (1966)
64. MAYERSBACH, H. und KRAFT-KINZ, J.: Die Gefriertrocknungstechnik für chirurgische Arterientransplantate.
Langenbecks Arch. klin. Chir. 293: 36 - 45 (1959)
65. MEEKER, J.A., and GROSS, R.E.: Low temperature sterilization of organic tissue by high-voltage cathode-ray irradiation.
Science 114: 233 - 235 (1951)
66. MEEKER, J.A., and GROSS, R.E.: Sterilization of frozen arterial grafts by high-voltage cathode-ray irradiation.
Surg. 30: 19 - 28 (1951)
67. MILLER, B.I., GIBBON, J.H. and FINEBERG, Ch.: An Improved Mechanical Heart and Lung Apparatus: its use during open Cardiomyotomy in experimental animals.
Med.Clin. N.A. 37: 1603 - 1624 (1953)
68. MORTENSEN, J.D., WEED, L.A. and GRINDLAY, J.H.: Maintaining sterility during storage of arterial homografts.
J. Lab. and Clin. Med. 44: 604 - 603 (1954)
69. MURRAY, G.: Aortic valve transplants
Angiology 11: 99 - 102 (1960)
70. MURRAY, G., ROSCHILAU, W., and LOUGHNEED, W.: Homologous aortic-valve-segment transplants as surgical treatment for aortic and mitral insufficiency.
Angiology 7: 466 - 471 (1956)
71. NEUMANN, K.: Grundriß der Gefriertrocknung.
Musterschmidt Wissenschaftl. Verlag, Göttingen - Frankfurt - Berlin (1955)
72. NEUMANN, R.E., and LOGAN, M.A.: The determination of Collagen and Elastin in Tissues.
J.Biol.Chem. 186: 549 - 556 (1950)

73. NEUMANN, R.E.,
and LOGAN, H.A.: The determination of Hydroxyproline.
J.Biol.Chem. 184: 299 - 306 (1950)
74. PIA, H.W.: Lyophilisierte Dura.
B. Braun - Arbeitstagung, Kassel-
Wilhelmshöhe (30./31.5.1969)
75. PIA, H.W.: Indikation zur Duraplastik unter be-
sonderer Berücksichtigung lyophili-
sierter Dura.
Mels.Med. Mit. 41: 61 - 69 (1967)
76. PICKERING, B.: The preparation and storage of aortic
valve homografts.
Guy's Hosp. Rep. 115: 105 - 117 (1966)
77. PORTER, K.A.: Tissue and Organ Transplantation.
Symp. Tissue Org. Transplant. (1967)
(suppl. J. clin. Path.), B.M.A. House
London, 1967)
78. PROCKOP, D.E., and
UDENFRIED, S.: A specific method for the analysis of
hydroxyproline in tissues and urine.
Analyt. Biochem. 1: 228 - 239 (1960)
79. RAPOPORT, S.M.: Medizinische Biochemie.
VEB Verl. Volk und Gesundheit,
Berlin (1962)
80. RAUSKOLB, R.: Untersuchungen zur Methodik der Be-
stimmung von Hydroxyprolin im Sehnen-
gewebe.
Inaug. Diss. Gießen (1967)
81. REY, L.R.: Diapositiv pour l'examen microscopique
aux basses temperatures.
Zit. nach THOMAS, J.A.
In: SURVIE ET CONSERVATION BIOLOGIQUE
Masson et Co., Paris (1963)
82. REYNOLDS and OLIVIER: Zit. nach CARPENTIER
In: Traitement des lésions valvulaires
aortique par des greffes hétéropla-
stiques.
R. Foulon et Co., Paris (1966)

83. ROSS, D.N.: Homograft replacement of the aortic valve.
Brit.J.Surg. 54: 842 - 845 (1967)
84. ROSS, D.N.: Persönliche Mitteilung
85. ROSS, D.N.: Aortic-valve replacement.
Lancet 27: 461 - 463 (1966)
86. ROSS, D.N.: Homoplastischer Ersatz der Aortenklappe.
XVII. Int. Kongr. Europ. Ges. für Herz-
und Kreislaufchirurgie, London (1968)
87. SABURO SUGIE, MASAT-
SUGO WATANABE, TA-
KASHI AOKI, TADASHI
HARUKAMI, TATSUZO
TANABE, HASAMITSU TA-
KAGI, YOSHITAKO KUBO,
SATOMI OHTA, KRIJI
MISAKA, MITSUYOSHI
TOMIYAMA, and MAKATO
SUGIYAMA: Clinical experience with supported
homograft heart valve for mitral and
aortic valve replacement.
J. Thorac. and Cardiovasc. Surg. 57:
455 - 462 (1969)
88. SCOTT, H.W., FORSTER,
J.H., KIRTLEY, J.A.,
and CARLSON, R.J.: Follow-up study of patients with
arteriosclerotic aneurysm of the ab-
dominal aorta treated by resection and
freeze-dried homograft.
Surgery 45: 445 - 453 (1959)
89. SENNING, Å. und
TSAKARIS, A.: Erste Ergebnisse einer neuen operativen
Korrektur der Aortenklappenfehler.
Cardiologia 44: 259 - 266 (1964)
90. SENNING, Å.: Rekonstruktion der Mitralklappe:
Homoioplastik
Thoraxchirurgie 16: 601 - 605 (1968)
91. SENNING, Å.: Fascia lata replacement of aortic valves
J. Thorac. and Cardiovasc. Surg. 54:
465 - 470 (1967)
92. SENNING, Å. und
LARGADIER, R.: Homologe Transplantation von Mitralklap-
pen beim Menschen: Transplantat-
beschaffung und erste Anwendungen.
Welsunger Med. Mitt. 41: 79 - 84 (1967)

93. SZILAGYI, D.E., OVER-
HULSE, P.R., SHONNARD,
C.P., and LOGRIPPO, G.A.: The sterilization of human arterial
homografts with Beta-propiolactone.
Surg. Forum 5: 244 - 252 (1954)
94. STARR, A., and
EDWARDS, M.L.: Mitral replacement: Clinical experience
with a ball valve prosthesis.
Ann. Surg. 154: 726 - 740 (1961)
95. STARR, A. and
EDWARDS, M.L.: Mitral replacement: The shielded ball
valve prosthesis.
J. Thorac. and Cardiovasc. Surg. 42:
673 - 682 (1961)
96. STARR, A., HERR, R.H.,
and WOOD, J.A.: The present status of valve replacement.
J. Thorac. and Cardiovasc. Surg. 8:
95 - 103 (1966)
97. STEGEMANN, H.: Mikrobestimmung von Hydroxyprolin mit
Chloramin-T und P-Dimethylaminobenzal-
dehyd.
Z. physiol. Chem. 310: 41 - 45 (1958)
98. STUTTE, H.J., BERNHARD,
A. und THIELE, F.: Präparation und Konservierung homolo-
ger und heterologer Aortenklappentrans-
plantate.
Zbl. f. Chir. 94: 33- 45 (1969)
99. THOMAS, C.C.A.: Sterilization by ethylene oxide.
Guy's Hosp. Rep. 109: 57 - 74 (1960)
100. THOMAS, J.A.: Survie et conservation biologique.
Masson et C^{ie}, Paris (1963)
101. TRAFAS, P.C., CARLSON,
R.E., LOGRIPPO, G.A.,
and LAM, C.R.: Chemical sterilization of arterial
homografts.
Arch. Surg. 69: 415 - 424 (1954)

102. WADA, J.:

A new hingeless valve.
Second national conference on
prosthetic heart valves.
Los Angeles, California, May 30 - June
1, 1968

103. YATES, A.K.:

L'homogreffe valvulaire aortique
Ann. Chir. Thor. Car. 5: 268 - 270
(1966)

Herrn Prof. Dr. K. Voss schulde ich für sein Interesse an meiner Arbeit und für die Erlaubnis, die Einrichtungen der Chirurgischen Universitätsklinik bei meinen Experimenten zu benutzen, zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. L. Róka möchte ich für seine kritischen Hinweise zur Methodik der chemischen Untersuchungen und der Interpretation der Ergebnisse besonders herzlich danken.

Seinem Mitarbeiter Herrn Dr. H. Haas danke ich für seine Unterstützung bei der Durchführung der chemischen Analysen und Herrn Dipl. Psych. Dr. D. Beckmann für sein Entgegenkommen bei der statistischen Sicherung der Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. G. Beneke und Herrn Dr. W. Schmitt, Ulm, gilt mein Dank für ihre Ratschläge und Unterstützung bei der Durchführung der histologischen und histometrischen Untersuchungen.

Herrn Prof. Dr. J. Kracht danke ich für seine freundliche Stellungnahme zur Interpretation der morphologischen Befunde.

Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Gierhake danke ich für die bakteriologische Untersuchung des Versuchsmaterials und der Aortenklappentransplantate, die klinische Anwendung fanden.

Herrn F. Kniese, Marburg, möchte ich für die technische Beratung beim Bau unserer Gefriertrocknungsanlage danken, sowie der Firma B. Braun, Melsungen, für ihre großzügige finanzielle Unterstützung bei der Entwicklung der Transplantatherhaltung für den Mitralklappenersatz.

Mein besonderer Dank gilt auch den technischen Assistentinnen Frau E. Conrad und Frau K. Drohmann, deren unermüdliche Mitarbeit wesentlich zur Durchführung der Untersuchungen beitrug.

